

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
KEEMIA INSTITUUT

Egle Truuman

Proteiinkinaas A substraadi RRASVA asa-analoogide süntees aktivaatoriga

COMU

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendajad: Anu Ploom, PhD

Meeli Arujõe, MSc

TARTU 2018

INFOLEHT

Proteiinkinaas A substraadi RRASVA asa-analoogide süntees aktivaatoriga COMU

Peptiidid on tähtsad bioaktiivsed ühendid, mille kasutamist farmakoloogilistel eesmärkidel raskendab nende kiire ensümaatiline degradatsioon. Degradatsiooni pidurdamiseks kasutatakse peptiidide asemel peptidomimeetikuid, mille hulka kuuluvad ka asa-peptiidid. Asa-peptiidide bioaktiivseid omadusi on aga vähe uuritud, kuna puuduvad efektiivsed meetodid nende sünteesimiseks.

Käesoleva töö eesmärgiks oli sünteesida proteiinkinaas A minimaalse substraadi RRASVA asa-analoogid, kasutades asa-peptiidsideme sünteesil aktivaatorit COMU. H-RRASVasaA-NH₂ ja H-RRasaASVA-NH₂ sünteesiti tahke faasi peptiidsünteesi eeskirja järgi. Töö tulemusena järeldati, et asa-peptiidi sünteesimetoodika vajab veel optimeerimist nii asa-aminohappe kinnitumisel tahkele kandjale kui ka asa-peptiidsideme moodustamisel.

Märksõnad: asa-peptiid, asa-peptiidsüntees, COMU, SPPS

P390 – Orgaaniline keemia

The synthesis of the aza-analogues of protein kinase A substrate RRASVA with the activator COMU

Peptides are important bioactive compounds but using them for pharmacological purposes is complicated due to their rapid enzymatic degradation. Peptidomimetics such as aza-peptides are used instead of peptides. However, the bioactive properties of aza-peptides are less studied due to the difficulties of the synthesis of them.

The purpose of this work was to synthesize aza-analogues of RRASVA as minimal substrate for protein kinase A using COMU as a coupling reagent for aza-peptide bond synthesis. H-RRASVasaA-NH₂ and H-RRasaASVA-NH₂ were synthesized by using solid phase peptide synthesis methods. In conclusion, aza-peptide synthesis methods still require further development to couple the aza-amino acid efficiently on a solid support and to increase the reaction yield of aza-peptide bond formation.

Keywords: aza-peptides, aza-peptide synthesis, COMU, SPPS

P390 – Organic chemistry

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
1. SISSEJUHATUS.....	6
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
2.1 Peptiidid.....	7
2.2 Peptidomimeetikud ja nende olulisus. Asa-peptiidid	7
2.3 Tahke faasi peptiidisüntees.....	9
2.4 Tahke faasi asa-peptiidisüntees	13
2.5 Proteiinkinaasid	14
3. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	16
3.1 Kasutatud reagentid ja töövahendid.....	16
3.2 Asa-peptiidisüntees tahkel kandjal	17
3.2.1 Tahke kandja ettevalmistus	17
3.2.2 SPPS eeskiri Fmoc-i kasutamisel	17
3.2.3 Asa-alaniini prekursori lisamine tahkele kandjale	18
3.3 Atsüülimisreaktsiooni jälgimine TLC ja Kaiseri testi abil	19
3.3.1 TLC test.....	19
3.3.2 Kaiseri värvitest.....	19
3.4 Asa-peptiidide eemaldamine tahkelt kandjalt ning puhastamine	20
4. TULEMUSED JA ARUTELU.....	21
4.1 H-RRasaASVA-NH ₂ süntees ja analüüs	21
4.2 H-RRASVasaA-NH ₂ süntees ja analüüs	24
4.3 Hinnang H-RRASVasaA-NH ₂ ja H-RRasaASVA-NH ₂ sünteesile.....	25
5. KOKKUVÕTE.....	27
6. SUMMARY	28
KASUTATUD KIRJANDUS	29
TÄNUAVALDUS.....	33
LISAD	34

KASUTATUD LÜHENDID

ACN	atsetonitriil
AH	aminohape
Ala, A	alaniin
Amü	aatommassiühik
Arg, R	arginiin
ATP	adenosiintrifosfaat
BDMP	5-(1H-bensotriasool-1-üüloksü)-3,4-dihüdoksü-1-metüül-2H-pürroolium heksakloroantimonaat
Boc/Bzl	butüüloksükarbonüül-/bensüül-
BTC	bis(triklorometüül)karbonaat
cAMP	tsükliline adensiin-3',5'-monofosfaat
COMU	(1-tsüano-2-etoksü-2-oksoetüülideamiinooksü)dimetüülamino- morfoliino-karbenium heksafluorofosfaat
DCC	N,N'-ditsükloheksüülkarbodiimiid
DCM	diklorometaan
DIC	N,N'-diisopropüülkarbodiimiid
DiPEA	N,N-diisopropüületüülamiin
DMF	N,N-dimetüülformamiid
DNA	desoksüribonukleinhape
Et ₂ O	dietüüleeter
EtOAc	etüülatsetaat
EtOH	etanool
Fmoc/tBu	9-fluorenüülmetoksükarbonüül-/tert-butüül-
HATU	1-[bis(dimetüülamino)metüleen]-1H-1,2,3-triasool[4,5-b]püridiinium 3- oksido heksafluorofosfaat
HCTU	O-(6-klorobensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat
HDMC	N-[(5-kloro-3-oksido-1H-bensotriasool-1-üül)-4-morfolinüülmetüleen]- N-metüülmetaanamiinium heksafluorofosfaat
HF	vesinikfluoriidhape

HIV-1	inimese immuunpuudulikkuse viirus tüüp 1
HOAt	7-asa-1-hüdroksübensotriasool
HOBt	1-hüdroksübensotriasool
HPLC	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
HPLC-MS	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia-massispektromeetria
KCN	kaaliumtsüaniid
KT	Kaiseri test
Met, M	metioniin
PEG	polüetüleen glükool
Phe, F	fenüülalaniin
PKA	proteiinkinaas A
PyBOP	(bensotriasol-1-ülöksü)tris(dimetüülamino)tripürrolidinofoonium heksafluorofosfaat
PyOxim	[etüülsüano(hüdroksüimiino)atsetaat-O ²]tri-1-pürrolidinüülfoonium heksafluorofosfaat
RT	retentsiooniaeg
Ser, S	seriin
SPPS	tahke faasi peptiidisüntees
TBTU	O-(bensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüüluroonium tetrafluoroboraat
TFA	trifluoroetaanhape
TiS	triisopropüülsilaan
TLC	õhukese kihi kromatograafia
TMR	tuumamagnetresonantsspektroskoopia
Trp, W	trüptofaan
Tyr, Y	türosiin
UV-Vis	ultraviolett ja nähtav valgus
Val, V	valiin

1. SISSEJUHATUS

Peptiidid on bioaktiivsed ained, millel on oluline roll elusorganismides, kuid nende kasutamist ravimitena piirab nende kiire lagunemine ensüümide toimetel. Ensümaatilise degradatsiooni pidurdamiseks luuakse peptidomimeetikuid, mida saadakse aminohapete erinevatel modifikatsioonidel.

Peptidomimeetikute hulka kuuluvad ka asa-peptiidid, mis oma metaboolse stabiilsuse tõttu organismis on perspektiivikad ravimikandidaadid. Asa-peptiidide bioaktiivseid omadusi on aga vähe uuritud, sest meetodid asa-peptiidide sünteesimiseks vajavad veel täiustamist. Tahke faasi peptiidisünteesi (SPPS) eeskirja järgi sünteesitud asa-peptiidide saagised on väga madalad.

Meie teadusgrupis tegeletakse efektiivse asa-peptiidi sünteesimetoodika väljatöötamisega. Sellega seoses on kineetiliste meetoditega testitud asa-peptiidsideme moodustumist erinevate tahke faasi peptiidisünteesi aktivaatoritega. Leiti, et asa-peptiidsideme tekke reaktsiooni kiirus ja saagis sõltuvad aktivaatori struktuurist ning oksümal põhinevate aktivaatoritega COMU ja PyOxim läheb reaktsioon peaaegu lõpuni, kuigi asa-peptiidsideme moodustumise reaktsioon on palju aeglasem, võrreldes tavapeptiidsideme moodustumisega.[1] Mudel asa-peptiidis on testitud ka hüdrasino-terminaalsele otsale liituva aminohappe kõrvalrühmade steerilist efekti aktivaatoriga COMU ning leiti, et see mõjutab asa-peptiidsideme moodustumise kiirust oluliselt. Uurimuse tulemusena arvutati välja asa-alaniinile liituvate aminohapete maksimaalsed reaktsiooniajad.[2]

Samas ei ole aktivaatorit COMU varem kasutatud asa-peptiidide sünteesimiseks, vaid ainult kineetilisteks uuringuteks mudelpeptiidides asa-peptiidsideme moodustamiseks. Käesoleva töö eesmärgiks on sünteesida proteiinkinaas A minimaalse substraadi RRASVA asa-analoogid RRASVasaA ja RRasaASVA, kasutades asa-peptiidsideme sünteesil aktivaatorit COMU.

Praeguseks on teada, et peptiidi selgroos tehtavad muudatused mõjutavad substraadi sidumise afiinsust ning fosforüleerimisreaktsiooni efektiivsust PKA poolt.[3,4] Seega aminohapete asendamine asa-aminohapetega antud peptiidi substraadis annaks võimaluse uurida asenduse mõju fosforüleerimisreaktsiooni kiirusele ning substraadi seostumise efektiivsusele ensüümiga, mille kohta senini uuringud puuduvad. Tulemusi saaks rakendada uudsete peptidomimeetiliste ligandide loomisel.

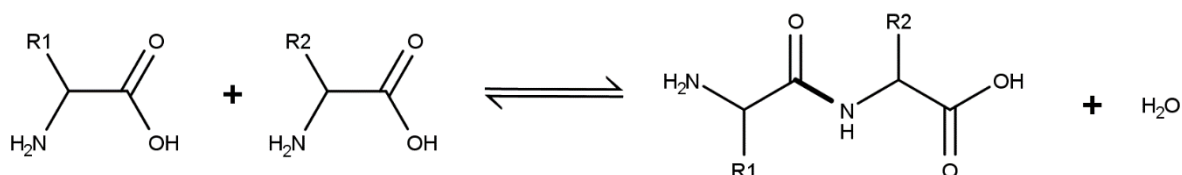
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1 Peptiidid

Peptiidid on biopolümeerid, mille monomeerideks on amiid- ehk peptiidsidemega seotud aminohapped (Skeem 1). Looduses on üle 700 aminohappe, millest olulisemad on 20 standardaminohapet, mis erinevad üksteisest kõrvalahela poolest ning mida kodeerib DNA valgusünteesi käigus.[5,6] Need on α -aminohapped, kus aminorühm moodustab sideme α -süsiniku aatomiga, mis on seotud karbonüülrühmaga.[6] Kõrvalahelate erinevus aminohapetes määrab nende erinevad biokeemilised rollid organismides.[7]

Peptiid koosneb kahest või enamast aminohappejäägist, seejuures oligopeptiidi moodustavad neli kuni kümme aminohappejääki. Polüpeptiid on peptiid molekulmassiga alla 5000 amü ning proteiini molekulmass on 5000 amü kuni 40 000 000 amü.[6] Ka struktuurilt võivad peptiidid erineda, omades näiteks kas lineaarset või tsüklilist struktuuri.[8]

Planaarse geomeetriaga peptiidside on püsiv hüdrolüüsi suhtes ning seepärast ka kineetiliselt suhteliselt stabiilne.[5,9] Aminohappejäägid peptiidiahelas võivad omavahel kui ka teiste peptiididega moodustada vesiniksidemeid ning disufliidsideid.[6]



Skeem 1. Peptiidsideme moodustumine, kus R1 ja R2 on aminohappe kõrvalrühmad.

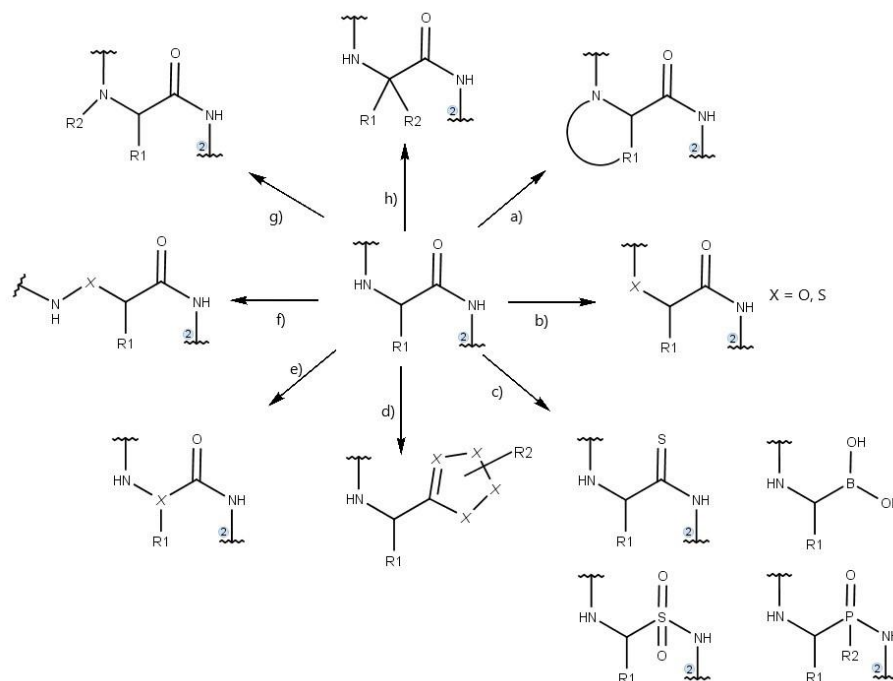
2.2 Peptidomimeetikud ja nende olulisus. Asa-peptiidid

Peptiididel on oluline roll peaaegu kõikides organismi bioloogilistes kui ka füsioloogilistes protsessides, näiteks hormoonidena, ensüümi inhibiitoritena või substraatidena ning seetõttu on võimalik neid kasutada mitmete ravimitena.[10,11] Terapeutiliste peptiidide kasutamine võimalike ravimikandidaatidena on aga raskendatud nende keemiliste ja ensümaatiliste omaduste pärast, nagu näiteks lühike poolestusaeg seedeelundites ja vereplasmas olevate proteolüütiliste ensüümide tõttu, mis inaktiveerivad peptiide. Samuti on nende suurest molekulmassist ja kõrgest polaarsusest tingitud halb membraani läbitavus.[12] Peptiidravimite arengut komplitseerib nende raskendatud suukaudne manustamine, kuna seedeensüümid lagundavad amiidsidemeid. Suukaudne manustamine on aga tihtipeale parim lahendus

kroonilise haigusega patsientide puhul.[11] Selleks, et vältida naturaalsete peptiidide soovimatuid omadusi organismis saab kasutada peptidomimeetikuid.[10]

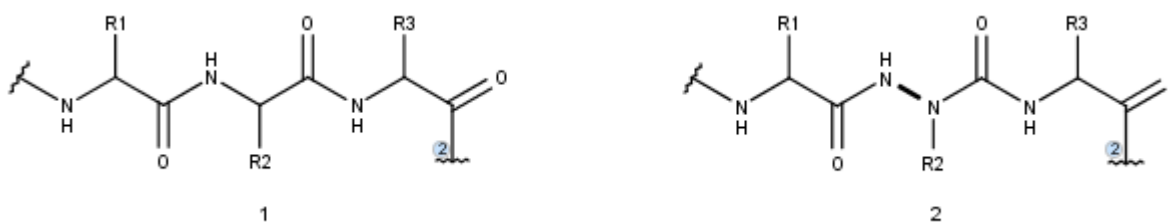
Peptidomimeetikud on peptiidisarnased ühendid, mis on oma struktuurilt analoogsed algse peptiidiga, säilitades samal ajal oma võime interakteeruda bioloogilise sihtmärgiga ja omades sama bioloogilist efekti.[13] Peptidomimeetikuid saadakse lineaarse peptiidi tsüklistseerimisel ja/või lisades peptiidiahelasse stabiilseid sünteetilisi aminohappeid, samuti muutes peptiidi sekundaarstruktuuri.[10,14]

Sünteetilisi aminohappeid saadakse modifitseerides algse aminohappe põhistruktuuri või kõrvalahelat (Skeem 2). Selleks võidakse asendada või tsüklistseerida kõrvalrühma, alküleerida aminorühma või teha isosteirilisi asendusi aminohappejäägi põhistruktuuris. Aminohappe põhistruktuuri saab modifitseerida, asendades karbonüülrühma, aminorühma või α -süsinikku või pikendades seda ühe või kahe aatomi abil. Isosteirilised asendused aminohappejäägi põhistruktuuris on olulised peptidikeemias, kuna tänu nendele peptidomimeetikute elektrostaatilised omadused ja sekundaarstruktuur muutuvad ning sageli farmakokineetilised omadused paranevad.[10] Peptidomimeetiliste ravimite loomisel pööratakse tähelepanu ka molekuli suurusele, sest väiksemad molekulid on tihtipeale sobilikumad suukaudsel manustamisel ning samuti odavamad toota.[11]



Skeem 2. Peptidomimeetikud, mis on saadud aminohappe a) tsüklistseerimisel, b) N-asendamisega, c) karbonüülrühma asendamisega, d) heterotsükklilisel töötlemisel, e) C_{α} -asendamisega, f) põhistruktuuri pikendamisega, g) N-alküleerimisega h) C_{α} -le R_2 rühma lisamisega, kus R_1 on kõrvalrühm ning R_2 on lisatud rühm, X on muudetud aatom.

Üheks võimaluseks stabiliseerida peptiidi on asendada α -süsinik ühes või mitmes aminohappejäägis lämmastiku aatomiga. Neid ühendeid nimetatakse asa-peptiidideks (Skeem 3).[10,15]



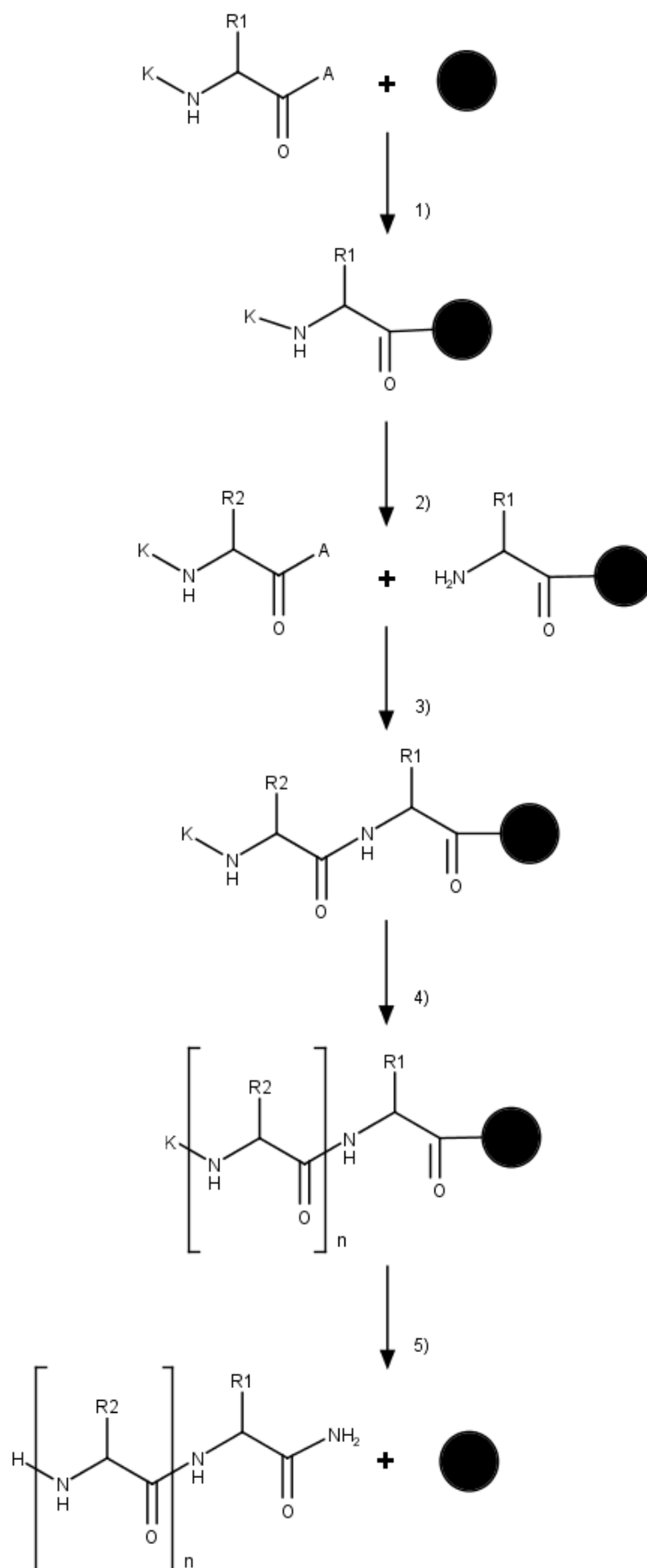
Skeem 3. Peptiid (1) ja asa-peptiid (2), kus R1, R2 ja R3 on kõrvalrühmad.

Asa-peptiidi molekuli erinevus algsest peptiidist on tingitud aminohappes C_{α} -C(O) sideme asendamisest jäigema N_{α} -C(O) sidemega, mille tõttu väheneb molekuli paindumus ning muutuvad selle keemilised ja bioloogilised omadused.[16] Asa-aminohappes puudub kiraalne tsenter ning α -lämmastikul olev vaba elektronpaar põhjustab resonantsi tänu millele on amiidside planaarsem. Aminorühm, mis on seotud α -lämmastikuga, on suurema happelisusega kui tavapeptiidis, tänu millele moodustab see tugevamaid vesiniksidemeid ning hoiab ära protoneerumist füsioloogilisel pH-l. Nimetatud omaduste tõttu muutuvad asa-peptiidide absorptsioon, jaotumine, transport ning ensüüm/retseptor seostumine organismis võrreldes peptiidiga.[17]

Asa-peptiidid on vastupidavamad ensümaatilise hüdrolüüsi suhtes ning seepärast on nad ka potentsiaalsed ravimikandidaadid.[10] Siiani on valmistatud mitmeid bioloogiliselt aktiivsete peptiidide asa-analooge, mille farmakoloogilised omadused võrreldes algse peptiidiga on paranenud. Asa-peptiide kasutatakse näiteks seriini ja tsüsteiini proteaasi inhibiitoritena ja A hepatiidi viiruse 3C inhibiitorina.[15,16] Tänapäeval on juba kasutusel mõned asa-peptiidravimid nagu Atazanavir ja Gosereliin. Atazanavir (Reyataz™) on asa-peptiidist proteaasi inhibiitor, mida kasutatakse täiskasvanute kui ka laste HIV-1 nakkuse ravimiseks ja Gosereliin (Zoladex®), mis on asa-glütsiinamiidi analoog, mida kasutatakse nii eesnäärme kui ka rinnavähi ravimiseks.[18–20]

2.3 Tahke faasi peptiidisüntees

Peptiidide saamiseks on kaks mittebiokeemilist võimalust: süntees lahuses ning süntees tahkel kandjal. Need meetodid erinevad sünteesi läbiviimise keskkonna poolest, kuigi mõlema üldpõhimõte on sama.[5]



Skeem 4. Tahke faasi peptiidisünteesi skeem, kus K on ajutine kaitserühm, A on aminohapet aktiveeriv rühm, R1 ja R2 on kõrvalrühmad koos püsivate kaitserühmadega (etappides 1 – 4), • on tahke kandja koos siduva rühmaga. 1) etapis toimub aminohappe kinnitamine tahkele kandjale, 2) etapis toimub kaitserühma eemaldamine, 3) etapis toimub uue aktiveeritud aminohappe sidumine N-terminaalselt kaitsmata aminohappega, 4) etapis korraldatakse eelnevaid etappe, et saavutada soovitud peptiidijärjestus, 5) etapis eemaldatakse kaitserühmad ja sünteesitud peptiid tahkelt kandjalt.

Peptiidisüntees tahkel kandjal loodi R. Bruce Merrifieldi poolt juba 1960ndatel (Skeem 4).[21] Merrifieldi meetodi puhul toimub aminohapete sidumine ning ajutise kaitserühma eemaldamine lahustumatu polümeeri või tahke kandja pinnal. Üleliigsed reagendid ning kõrvalproduktid eemaldatakse iga etapi järel põhjaliku pesuga.[5] Kasutatav polümeer peab olema lahustumatu kõikides lahustites, mida sünteesi ajal kasutatakse. Samuti peab see sisaldama funktsionaalrühma, millega esimene N-kaitsstud aminohappe C-terminaalne ots saab kovalentse sidemega seostuda.[21]

Tahke faasi peptiidisüntees (SPPS) on suunatud reaktsioon $N \leftarrow C$, sest aminohapete aminorühmadel ja kõrvalahelatel on kaitserühmad, sünteesil kasutatakse tahket kandjat ning aktivaatoreid. Aminohapete kõrvalahelatel on püsivad kaitserühmad, mis võimaldavad aminohappe aktiveeritud C-terminaalse otsa seostumist kaitsmata aminohappe N-terminaalse otsaga.[22] Kasutatavaimad kaitserühmade kombinatsioonid on Boc/Bzl ja Fmoc/tBu. Eelistatavam neist on Fmoc/tBu-meetodi kasutamine, kuna Boc/Bzl-meetodil kõrvalahelalt kaitserühmade eemaldamiseks kasutatav HF on väga mürgine ning tugevalt happeline keskkond võib põhjustada muutusi peptiidi struktuuris.[23]

Peptiidide sünteesimiseks on tänapäeval võimalik kasutada süntesaatoreid.[21,24] Need võivad olla poolautomatiseeritud, kus toimub automaatne vahepesu ja kaitserühmade eemaldamine või täisautomatiseeritud, mis sünteesivad terve peptiidi või isegi mitu peptiidi paralleelselt.[22]

Merrifieldi sünteesil on kolm kõige olulisemat etappi. Esiteks esimese aminohappe kinnitumine tahkele kandjale.[21] Kasutatavad polümeerid erinevad materjalide poolest, näiteks polüstüreen, polüstüreen-funktsioneeritud polüetüleen glükool (PEG) ja risti seotud PEG, millele on kinnitatud või kinnitatakse *linker* (siduv rühm).[23,25]

Teiseks etapiks on seotud aminohappe N-terminaalsest otsast ajutise kaitserühma eemaldamine, näiteks Boc-kaitserrühma eemaldamine happelise töötlusega (TFA) või Fmoc-kaitserrühma eemaldamine aluselise töötlusega (piperidiini lahus).[5,22]

Kolmandaks etapiks on peptiidsideme moodustumine N-kaitstud ning eelnevalt aktiveeritud aminohappe ja tahkele kandjale seotud kaitsmata aminohappe kondensatsioonil.[5] Peptiidsideme moodustumine on energiat vajav reaktsioon ning seepärast aktiveeritakse lisatava aminohappe karboksüülrühm kasutades erinevaid aktivaatoreid. Selle tulemusel aktivaatorid moodustavad aminohapetega erinevaid aktiivseid karboksüderivaate.[22,26,27] Karboksüülrühma aktivatsioon peab toimuma koheselt, sest aktivaatorid lagunevad kiiresti ning nende toime kaob.[27] SPPS-i jaoks välja töötatud ja kasutusel olevaid aktivaatoreid on väga palju, mis erinevad üksteisest struktuuri, lahkuva rühma ning aminohapetega moodustavate aktiivsete vaheühendite poolest.[28] Nende erinevus seisneb ka aminohapete kondensatsiooniajas, produktide puhtuses ning saagises. Kuigi erinevused kondensatsiooniajas on enam kasutatavate aktivaatorite puhul väga väikesed, sest tahke faasi peptiidsüntees toimub kiiresti.[28–30]

SPPS-is enim kasutatavad aktivaatorid on karbodiimiidid (nt DCC ja DIC), oksüma derivaadid (nt COMU ja PyOxim) ja bensotriasooli derivaadid (nt HATU, TBTU, PyBOP ja BDMP), mida omakorda on võimalik klassifitseerida uroonium/amiinium (HATU ja TBTU), fosfoonium (PyBOP) ja immoonium (BDMP) sooladeks.[28,31] Bensotriasooli derivaate on soovitatav kasutada koos HOAt-iga või HOBt-iga, mis on abistavad nukleofiilid ning mida lisatakse, et hoida ära kõrvalreaktsioone.[22] Need suurendavad kondensatsioonireaktsiooni saagist, kuna hoitakse ära mittereageeriva N-atsüüluurea moodustumine ning samuti vähendatakse oksasoolooni moodustamisest tingitud ratsemisatsiooni.[31]

Neist aktivaatoritest on COMU üks uuemaid ja efektiivsemaid, tänu selle heale lahustumisele DMF-s ning võimalusele valmistada kontsentreeritumaid lahuseid kui nt HATU-ga.[32] Samuti saavutati COMU kasutamisel koos kahe ekvivalendi alusega kõrgeimad saagise protsendid nii SPPS-is kui ka peptiidsünteesis lahuses ning suurem produkti puhtus sõltumata kondensatsiooniajast.[29,33] Samas on COMU kasutamine piiratud hüdrofüülsuse ebastabiilsuse tõttu automatiseeritud SPPS-i puhul.[32]

Kui peptiid on täielikult sünteesitud ehk on korratud sünteesietappe 2) ja 3) nii mitu korda kuni on saavutatud soovitud järjestus, on viimaseks etapiks kõrvalahelatelt kaitserühmade ning peptiidi tahkelt kandjalt eemaldamine. Need protsessid toimuvad samaaegselt tugeva happe toimel.[5,21,23]

2.4 Tahke faasi asa-peptiidisüntees

Traditsiooniline asa-peptiidisüntees hõlmab endas hüdrasiini keemia ja peptiidisünteesi kombinatsiooni, et asendada peptiidis ühes või mitmes aminohappes α -süsinik lämmastiku aatomiga.[15] Asa-peptiidisüntees on keerukam kui peptiidisüntees. Seda iseloomustab madalam saagis, asa-aminohapete prekursorite vajalikkus ning sobivate aktivaatorite puudumine.[1,16]

Asa-peptiidide sünteesiks on vajalikud asa-aminohappe prekursorid, sest asa-aminohapped ei ole stabiilsed. Asa-aminohapete prekursoritena kasutatakse N-kaitstud alküülhüdrasiine, mille sünteesiks on olemas kaks põhilist meetodit.[34] Esimene ja sagedamini kasutatav meetod N-kaitstud alküül- ja arüülhüdrasiinide sünteesiks on hüdrasiinide redutseeriv alküleerimine, kus N-kaitstud hüdrasiinist ja vastavast aldehüüdist moodustatakse hüdrasoon ning see redutseeritakse vastavaks N-kaitstud alküülhüdrasiiniks.[16] Kuid sellel meetodil on negatiivseid aspekte, nagu kallite katalüsaatorite vajalikkus ning vesinikuga varustamise süsteem ja keerukas aparatuur, millega oleks võimalik töötada kõrgendatud rõhkudel. Teine sünteesimeetod seisneb otsesel N-kaitstud hüdrasiini N-alküleerimisel sobiliku alküülhaliidiga.[34] Asa-aminohappe prekursorid ei ole kaubanduslikult kättesaadavad ning nende sünteesimeetodite arendamisega on tegelenud Tartu Ülikooli Orgaanilise keemia õppetoolis Anton Mastitski teadusgrupp [34–36], kuid mitmete asa-aminohapete prekursorite, näiteks asaAla, asaArg, asaMet, asaTyr, asaPhe ja asaTrp sünteesimeetodid vajavad veel täiustamist.

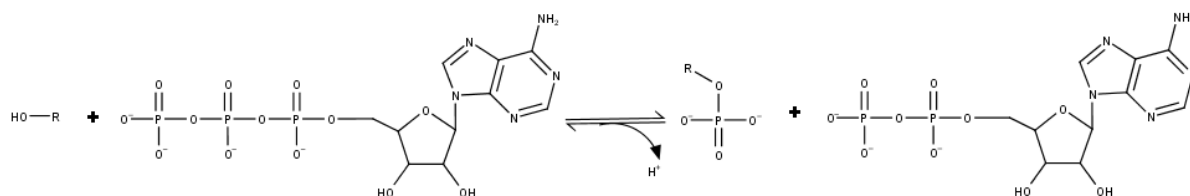
Asa-peptiidide sünteesiks tahkel kandjal on kasutatud põhiliselt kolme meetodit: 1) tahkele kandjale kinnitatud aminohappe N-terminaalse otsa muutmise isotsüanaadiks või aktiivseks karbamaadiks ning järgnev reaktsioon sobiliku asa-aminohappe prekursoriga 2) asa-aminohappe prekursori aktiveerimine trifosgeeni toimel kloroatsüüldeerivaadiks ning selle sidumine N-kaitsmata aminohappega tahkel kandjal või 3) N-kaitstud asa-di- või tripeptiidide fragmentide viimine nii lahuses kui ka tahkel kandjal sünteesitud peptiidi.[16,37]

Asa-peptiidisideme moodustumine on tunduvalt aeglasem kui peptiidisideme moodustumine ning peptiidisünteesi eeskiri ei ole enam otseselt rakendatav asa-aminohappejäägile järgneva aminohappe lisamisel. See on tingitud α -aminohappe ja selle asa-derivaadi aminorühmade nukleofiilsuste erinevusest: asa-derivaadi aminorühma nukleofiilsus on väiksem kui vastava α -aminohappe oma.[38] Seetõttu ei toimi peptiidisünteesis kasutatavad aktivaatorid asa-peptiidisünteesis samamoodi. Nukleofiilsuste erinevust ei võeta aga arvesse ja asa-peptiide sünteesitakse enamasti peptiidisünteesi eeskirja järgi.[16]

Varasemalt on võrreldud meie teadusgrupis mudelpeptiidis kineetiliste meetoditega erinevate peptiidisünteesi aktivaatorite rakendatavust asa-peptiidsideme sünteesil. Aktivaatoritena kasutati COMU, PyOximit, PyBOP-i, HDMC-i, HCTU-d, HATU-t ja DIC-i. Tõhusaimateks aktivaatoriteks osutusid COMU ja PyOxim, kuid asa-peptiidsideme sünteesiaeg pikenes siiski umbes 30 korda võrreldes peptiidisünteesiga. Sealjuures oli ka HATU suhteliselt efektiivne, kuid vajab veel pikemat reaktsiooniaega.[1] Hiljuti meie teadusgrupis tehtud kineetiline uurimus mudel asa-peptiidis aktivaatoriga COMU näitas, et lisaks aktivaatorile sõltub asa-peptiidsideme moodustumine oluliselt ka asa-aminohappejäägile lisatava aminohappe kõrvalahela steerilisest takistusest, millest tulenevalt on kondensatsiooniaeg kas lühem või pikem. Kui näiteks asa-alaniinile lisatava glütsiini reaktsiooni poolestusaeg oli 21 minutit, siis isoleutsiini poolestusaeg oli vastavalt 10 tundi.[2] Seega on vaja asa-peptiidide sünteesimeetodeid arendada, mis võimaldaks neid automatiseeritult sünteesida ja see omakorda annaks võimaluse asa-peptiidide bioaktiivsust laiaulatuslikumalt uurida

2.5 Proteiinkinaasid

Proteiinkinaasid on ühendid, mis katalüüsivad proteiini fosforülatsiooni, mille käigus kantakse ATP molekulist γ -fosfaatrühm türosiini, seriini või treoniini jääkidele proteiinis (Skeem 5).[39,40]

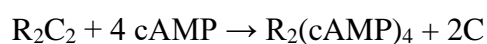


Skeem 5. γ -fosfaatrühma ülekanne proteiinkinaas A poolt, kus R on peptiid.

Nad on suurim ensüümide perekond, mis võtab osa raku signaaliülekandest.[39] Proteiinkinaasidel on väga oluline roll raku funktsioneerimises: kontrollides metabolismi, transkriptsiooni, raku jagunemist ja liikumist, rakusurma ning samuti osalevad nad immuunvastuses ja närvisüsteemi funktsioneerimisel. Proteiinkinaasid saavad muuta proteiini funktsiooni paljudel viisidel. Proteiini fosforülatsioon saab suurendada või vähendada ensüümide aktiivsust, mis võib omakorda mõjutada teisi bioloogilisi protsesse nagu transkriptsioon ja translatatsioon. Fosforüleerimine võib stabiliseerida või destabiliseerida valku või soodustada valgu liikumist ühest raku asukohast teise.[41]

Manning jt grupeerisid eukarüootse organismi proteiinkinaasid üheksasse suurde rühma, millest ühe moodustab AGC rühm.[42] AGC rühm koosneb 63 seriini/treoniini proteiinkinaasist, mis sisaldab ka cAMP sõltuvat proteiini kinaasi A (PKA).[43] cAMP ehk tsükliline adenosiin-3',5'-monofosfaat on rakusisene sekundaarne virgatsaine, mis mõjutab mitmete valkude sealhulgas ka PKA aktiivsust raku sees.[9]

Inaktiivne PKA on tetrameerne holoensüüm R_2C_2 , mis koosneb kahest regulaarsest ja kahest katalüütilisest alaühikust. Kui PKA liitub nelja cAMP molekuliga, siis holoensüüm dissotseerub kaheks aktiivseks katalüütiliseks alaühikuks ja dimeerseks regulatoorseks alaühikuks, mille mõlemad monomeerid seovad kaks cAMP molekuli (Skeem 6).[41]



Skeem 6. PKA liitumine 4 cAMP molekuliga.

Katalüütilised alaühikud on vees lahustumatud proteiinid, millel on katalüütiline aktiivsus ning nad interakteeruvad ATP molekuliga ja peptiidi substraatidega. Need alaühikud koosnevad 350 aminohappejäägist ja 245 neist kuuluvad katalüütiliste alaühikute põhikoosseisu, mis on omane kõigile proteiinkinaasidele.[44] Tänu mitmetele analüüsidele ja uuringutele on teada, et leidub katalüütilise alaühiku poolt ära tuntav substraadi lühim aminohappejärjestus [45–47], milleks on peptiid RRASVA.

Eelnevate uuringute põhjal on teada, et substraadi liitumine PKA sidumiskohaga ning substraadi fosforüleerimisreaktsiooni efektiivsus PKA toimel sõltub peptiidi selgroos tehtavatest muudatustest.[3,48] Varasemalt on sünteesitud meie uurimisgrupis erinevaid RRASVA $\text{asa-}\beta^3$ -derivaate ja N^β -metüül- $\text{asa-}\beta^3$ -derivaate, kus on asendatud nii üks kui ka kaks aminohappejääki $\text{asa-}\beta^3$ -aminohappejäägiga või N^β -metüül- $\text{asa-}\beta^3$ -aminohappejäägiga ning uuritud nende ühendite fosforüleerimist PKA poolt.[4,48] Kuigi $\text{asa-}\beta^3$ -aminohappejäägi lisamisel algsele peptiidi fosforüleerimisreaktsiooni efektiivsus väheneb, võrreldes algse peptiidiga, siis seostumine PKA sidumiskohaga paraneb.[4,44] Leiti ka, et asenduste positsioonist sõltub peptidomimeetiliste substraatide sidumise tõhusus.[44] Veel üheks võimaluseks muuta peptiidi struktuuri on läbi viia α -skaneerimine peptiidis, viies algsele peptiidi α -aminohappeid. Siiani aga ei ole RRASVA α -derivaatide fosforüleerimist PKA poolt uuritud kuna nende ühendite sünteesimiseks puuduvad efektiivsed meetodid. Oodatavad tulemused võivad viia uudsete peptidomimeetiliste ligandide loomiseni.

3. EKSPERIMENTAALNE OSA

Töö eesmärgid:

- Sünteesida SPPS meetodil ja puhastada PKA substraadi RRASVA asala analoogid, kasutades asala-aminohappe hüdrasino-terminaalse otsa atsüülimiseks aktivaatorit COMU.
- Analüüsida aktivaator COMU efektiivsust asala-peptiidsideme moodustumisel, kasutades kõrgefektiivset vedelikkromatograafi massispektromeetriga (HPLC-MS).

3.1 Kasutatud reagentid ja töövahendid

Reagent	MW, g/mol	Puhtus, %	Tootja
ACN	41,05	≥99,90%	Honeywell
BTC	296,75	≥96,0%	Merck
COMU	428,27	97%	Acros organics
DCM	84,93	≥99,90%	Sigma-Aldrich
DMF	73,09	≥99,80%	Sigma-Aldrich
Et ₂ O	74,12	99,90%	Lach-Ner
DiPEA	129,25	≥98,0%	Fluka
Fenool	94,11	89,0%	Amresco
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,77	≥98,0%	Sigma-Aldrich
Fmoc-L-Ala-OH · H ₂ O	329,33	-	Iris Biotech
Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	383,44	-	Iris Biotech
Fmoc-L-Val-OH	339,39	-	Iris Biotech
Fmoc-NH-NH-CH ₃	268,3	Kontrollitud ja määratud TLC ja TMR-ga	Sünteesitud Anton Mastitski töögrupi poolt
Fmoc-Rink-Amid MBHA	Loading 0,68 mmol/g	-	Iris Biotech
HATU	380,23	97%	Sigma-Aldrich
HCTU	413,69	≥98%	Sigma-Aldrich
HOBt · x H ₂ O	153,12	≥97,0	Sigma-Aldrich
Ninhüdrin	178,14	≥95,0%	Sigma-Aldrich
Piperidiin	85,15	99,0%	Sigma-Aldrich

PyOxim	527,38	≥97,5%	Sigma-Aldrich
TBTU	321,09	-	Iris Biotech
TFA	114,02	99,0%	Sigma-Aldrich
TiS	158,36	99,0%	Sigma-Aldrich

Peptiidijärjestust analüüsiti Shimadzu LCMS-2020 kromatograafia 220 nm juures, kasutades Kinetex 5µM EVO pöördfaas kolonni (C₁₈, 100Å, 250 x 4,6 mm). Proovide voolutamisel kasutati puhvrit A 0,1% TFA/MilliQ ja puhvrit B 0,1% TFA/ACN. Proove elueeriti, kasutades programmi, milles puhver B sisaldus oli 2-30% ning voolukiirus oli 1 ml/min. Kasutati manuaalset proovisisendit ning programmil lasti kesta 20 minutit. Andmeid analüüsiti ning töödeldi programmiga LabSolutions Version 5.82 SP1.

Asa-peptiide puhastati Shimadzu LC-20AD kromatograafia 220 nm juures, kasutades Phenomenex Luna 5µM pöördfaas kolonni (C₁₈(2), 100Å, 250 x 15 mm). Proovide voolutamisel kasutati puhvrit A 0,1% TFA/MilliQ ja puhvrit B 0,1% TFA/ACN. Asa-peptiidide puhastamisel kasutati programmi, milles puhver B sisaldus oli 5-40% ning voolukiirus oli 5 ml/min, kasutati manuaalset proovisisendit. Andmeid analüüsiti programmiga LabSolutions Version 5.82 SP1.

3.2 Asa-peptiidisüntees tahkel kandjal

3.2.1 Tahke kandja ettevalmistus

Asa-peptiidide sünteesimiseks tahkel kandjal kasutati 20 ml filterkolonni, kuhu esmalt kaaluti 250 mg (1 ekv; 0,17 mmol) vaiku Fmoc-Rink-Amiid MBHA. Tahkel kandjal lasti punduda 20 minutit DCM-is. Kaitserühma eemaldamiseks tahkelt kandjalt kasutati 20% piperidiini lahust DMF-is. Kõigepealt lasti reaktsioonil toimuda 2 minutit, siis eemaldati tekkinud ühendid vaakumfiltril abil ning lisati uuesti piperidiini lahus 20 minutiks. Kõrvalsaadused eemaldati ja vaik pesti 5 korda DMF-iga ja 1 kord DCM-iga. Vabade aminorühmade olemasolu kontrollimiseks tehti Kaiseri test (vt ptk 3.3.2).

3.2.2 SPPS eeskiri Fmoc-meetodi kasutamisel

- 1) Kolonnis oleval tahkel kandjal lasti punduda 20 minutit DCM-is.

- 2) Fmoc-kaitserühma eemaldamiseks lisati kolonnis olevale peptiidile 20% piperidiini lahust DMF-is esmalt 2 minutiks, seejärel eraldati jäägid ning lisati uus piperidiini lahus 20 minutiks.
- 3) Piperidiini lahus eemaldati koos kõrvalsaadustega ning vaiku pesti jääkide eemaldamiseks mõne ml DMF-iga (5 korda) ning DCM-iga (1 kord).
- 4) Teostati TLC ja Kaiseri test Fmoc-kaitserühma eemaldamise kontrollimiseks (vt ptk 3.3). Kaiseri testi negatiivsel tulemusel korrati Fmoc-kaitserühma eemaldamise protsessi (etapp 3).
- 5) Kaaluti lisatav aminohape, aktivaator ja vajadusel abistav nukleofiil. Need lahustati DMF-is ja eelaktiveeriti 2 minutit.[49] Saadud lahus lisati koos DCM-i ja DiPEA-ga vabu aminorühmi sisaldavale vaigule (aminohape, aktivaator, abistav nukleofiil, alus 1:1:1:2 ekv).
- 6) Kondensatsioonireaktsioonil lasti toimuda vähemalt 1 tund.
- 7) Kõrvalproduktide ning reagentide ülehulga eemaldamiseks pesti vaiku mõne ml DMF-iga (3 korda), DCM-iga (3 korda), DMF-iga (3 korda).
- 8) Sooritati Kaiseri test, et veenduda aminohappe seondumises vaigule (vt ptk 3.3.2). Positiivse Kaiseri testi tulemusel (test on sinine) korrati protseduure 5), 6) ja 7), suurendades reagentide ülehulki, pikendades reaktsiooniga või vahetades aktivaatorit.
- 9) Korrati etappe 2) – 8) kuni saavutati soovitud aminohappejärjestus.

3.2.3 Asa-alaniini prekursori lisamine tahkele kandjale

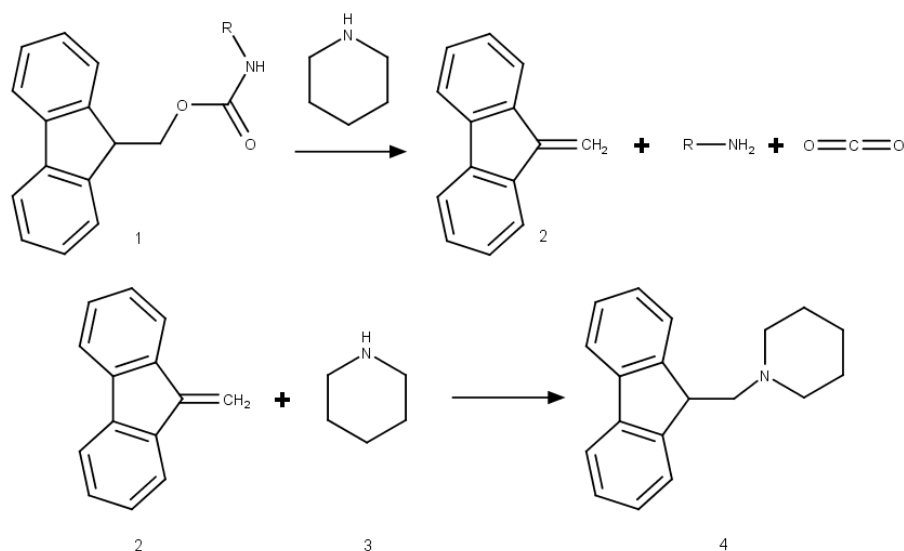
Asa-peptiidi sünteesimiseks kaaluti eelnevalt etüülatsetaadis ümberkristalliseeritud ning planaarkromatograafiaga kontrollitud Fmoc-NH-NH-CH₃ (4 ekv; 0,68 mmol) kuivatatud 50 ml ümarkolbi. Järgnev reaktsioon viidi läbi inertgaasi keskkonnas. Fmoc-NH-NH-CH₃ lahustati minimaalses koguses kuivas DCM-is ning lisati DiPEA (8 ekv) aluselise keskkonna saavutamiseks. Segu jahutati jäävannil 0°C-ni. Asa-aminohappe prekursori kloroatsüülimiseks kaaluti BTC (1,32 ekv), mis lahustati kuivas DCM-is ning kanti üle ümarkolbi. Asa-aminohappe prekursorit aktiveeriti jäävannil segades 30 min. Lenduvad kõrvalproduktid eemaldati rotaatoraurustiga. Reaktsioonisegu kanti minimaalse koguse DCM-iga eelnevalt filterkolonnis ettevalmistatud tahkele kandjale, millele oli lisatud DMF ja DiPEA (8 ekv) aluselise reaktsioonikeskkonna saavutamiseks. Eelnevalt kloroatsüülitud N-kaitstud asa-alaniini sidumisreaktsioonil tahkele kandjale lasti toimuda vähemalt 3 h. Kõrvalsaaduste ning reagentide ülehulga eemaldamiseks pesti segu DMF-iga (3 korda), DCM-iga (3 korda), DMF-

iga (3 korda). Vabade aminorühmade ärareageerimise kontrollimiseks teostati Kaiseri test (vt ptk 3.3.2). Asa-aminohappejäägi kinnitumist tahkele kandjale analüüsiti HPLC-MS-i abil. Selleks võeti väike kogus vaiku, millelt eemaldati tekkinud asa-aminohape/-peptiid (vt ptk 3.4).

3.3 Atsüülimisreaktsiooni jälgimine TLC ja Kaiseri testi abil

3.3.1 TLC test

Fmoc-rühma eemaldamisel tekib kõrvalsaadusena dibensofulveeni ja piperidiini ühend, mis fluorestseerub intensiivselt UV-kiirguses (Skeem 7).[50] Automaatse peptiidisünteesi puhul jälgitakse antud ühendi tekkimist UV-spektroskoobiga.[23] Kuid seda on võimalik jälgida ka manuaalse peptiidisünteesi korral, kus tekkinud ühendit saab visualiseerida TLC plaadil UV valguses. TLC testi suureks eeliseks on see, et ei kasutata tahket kandjat. Test sooritatakse pesulahuste põhjal ning seetõttu ei vähene sünteesitava peptiidi saagis. Mida rohkem sisaldab pesulahus kõrvalprodukte, seda intensiivsem on laik TLC plaadil, tänu millele on võimalik järeldada, et Fmoc-kaitserühm oli eemaldatud ning aminohape oli eelnevas etapis kinnitunud. Kvalitatiivne TLC test: Fmoc-kaitserühma eemaldamise käigus ning järgnevas pesuprotsessis võeti paar tilka pesulahust ning tilgutati TLC plaadile, mida vaadati UV valguses 254 nm juures.



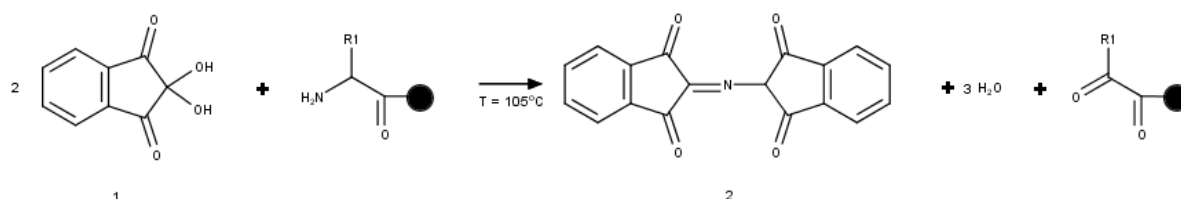
Skeem 7. Peptiidilt/peptidomimeetikult (R) (1) Fmoc-kaitserühma eemaldamisel tekkiv fluorestseeruv dibensofulveeni (2) ja piperidiini (3) ühend (4).

3.3.2 Kaiseri värvitest

Kaiseri test (KT) ehk ninhüdrini test sooritatakse kinnitamaks N-kaitsmata aminorühmade olemasolu peptiidis või veendumaks nende ärareageerimises lisatud aminohappe

karboksüülrühmadega.[51] Vabade aminorühmade reageerimisel ninhütriini molekuliga vabaneb kolm vee molekuli ning tekib Ruhemanni lilla, mille tulemusel on Kaiseri test positiivne ja selle värvus on sinakaslilla (Skeem 8). Katioonsete reaktsioonitsentrite puudumisel on test negatiivne ja helekollase värvusega.[52]

Kvalitatiivse testi sooritamiseks võeti väike kogus pestud vaiku ning lisati 1-2 tilka komponente A ja B. Komponendi A valmistamiseks kasutati 4 g fenooli, 1 ml EtOH ja 0,2 ml 1,3% KCN lahust püridiinis, komponendi B valmistamiseks kasutati 500 mg ninhütriini ja 10 ml EtOH. Testi kuumutati 105°C juures mitte kauem kui 5 minutit ning vaadeldi vaiguterade värvuse muutust/mittemuutust.



Skeem 8. Kaiseri test, kus kahe ninhütriini molekuli (1) reageerimisel vabade aminorühmadega üheks saaduseks on Ruhemanni lilla (2), R¹ on kõrvalrühm.

3.4 Asa-peptiidide eemaldamine tahkelt kandjalt ning puhastamine

Enne asa-peptiidi eraldamist tahkelt kandjalt eemaldati ajutine Fmoc-kaitserühm viimasena lisatud aminohappelt. Asa-peptiidi lõikamiseks tahkelt kandjalt ning kõrvalahelatelt püsivate kaitserühmade eemaldamiseks kasutati tugevalt happelist keskkonda (95% TFA; 2,5% MilliQ; 2,5% TiS). Selleks kanti vaik filtriga varustatud plastiksüstlasse ning lisati valmistatud happelahu (2 ml lahust 100 mg aine kohta). Reaktsioonil lasti toimuda vähemalt 3 tundi. Saadud asa-peptiidilahu kanti 10 ml-sse klaasviaali ning TFA aurutati õhuvoolus. Asa-toorpeptiidi ekstraheeriti kolm korda jääkülma eetriga, selles lahustuvate kõrvalproduktide eraldamiseks ning tsentrifuugiti. Sadenenud asa-peptiidilt eraldati eetri kiht ning eetri jäägid aurutati õhuvoolus. Seejärel lahustati asa-peptiid MilliQ vees, kanti üle plastikviaali, külmutati ja asetati kuivatamiseks lüofilisaatorisse. Määrati asa-toorpeptiidi mass.

Asa-toorpeptiidi analüüsiti HPLC-MS-iga ning seejärel puhastati preparatiivsel HPLC meetodil. Selleks lahustati asa-toorpeptiid minimaalses koguses voolutis. Saadud puhaste asa-peptiidide lahused külmutati, kuivatati lüofilisaatoris ning kaaluti puhta aine mass. Määrati ainete kromatograafilise puhtus HPLC-MS-iga 220 nm juures. Arvutati asa-peptiidi saagis:

$$\%(saagis) = \frac{m(\text{puhas asa} - \text{peptiid})}{m(\text{teoreetiline asa} - \text{peptiid})}$$

4. TULEMUSED JA ARUTELU

Käesoleva töö raames sünteesiti PKA substraadi RRASVA kaks asala derivaati SPPS eeskirja alusel, mida oli kohandatud asapeptiidide jaoks (Tabel 1 ja Tabel 2). Mõlemas substraadis asendati üksalaniin vastavalt asalaniiniga. Asapeptiidid sünteesiti kui C-terminaalsed amiidid. Asapeptiidsideme moodustamiseks kasutati aktivaatorit COMU. Sünteesitud asatoorpeptiidid puhastati preparatiivsel HPLC meetodil, määrati nende saagis ja kromatograafiline puhtus HPLC-MS-iga.

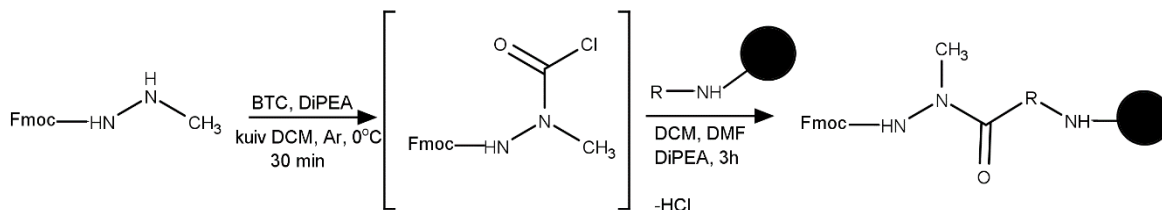
4.1 H-RRasaASVA-NH₂ süntees ja analüüs

Tabel 1. H-RRasaASVA-NH₂ süntees.

Järjestus/etapp	Aktivaator	t, (h)	KT	TLC test	HPLC-MS
Fmoc-A-NH -vaik	HCTU (5 ekv) HOBt (5 ekv)	1	+		
	COMU (5 ekv)	1	-		
Fmoc -kaitserühma eemaldamine				+	
Fmoc-VA-NH -vaik	COMU (5 ekv)	2	+		
	COMU (5 ekv)	4	-		
Fmoc -kaitserühma eemaldamine				+	
Fmoc-SVA-NH -vaik	COMU (5 ekv)	1	-		
Fmoc -kaitserühma eemaldamine				+	
Fmoc-asaASVA-NH -vaik	BTC (1,32 ekv)	3	-		+ (Lisa 1)
Fmoc -kaitserühma eemaldamine				+	+
Fmoc-RasaASVA-NH -vaik	COMU (10 ekv)	16	+		+ (Lisa 2)
	COMU (5 ekv)	22	-		+ (Lisa 3)
Fmoc -kaitserühma eemaldamine				+	
Fmoc-RRasaASVA-NH -vaik	HATU (5 ekv)	4	+		
	HATU (5 ekv)	16	-		
Fmoc -kaitserühma eemaldamine				+	+
Asa-toorpeptiid H-RRasaASVA-NH₂					+ (Lisa 4)
Puhastatud H-RRasaASVA-NH₂					+ (Lisa 5)

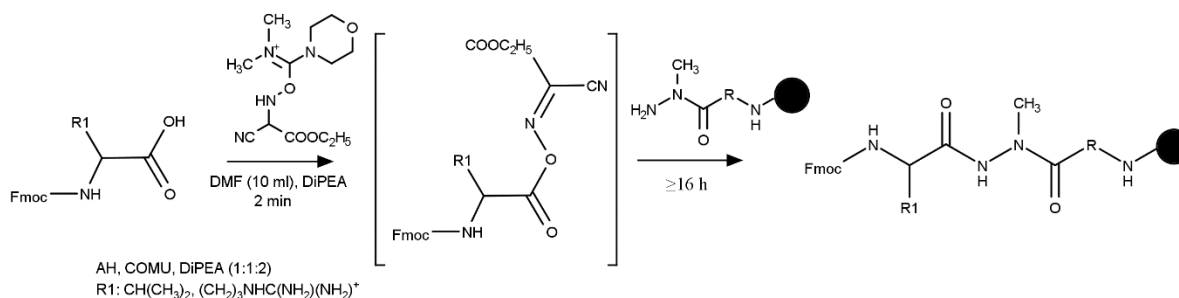
Asa-peptiidi H-RRasaASVA-NH₂ sünteesi (Tabel 1) alustati SPPS eeskirja alusel peptiidi Fmoc-SVA-NH-vaik sünteesimisega. Vajadusel (KT positiivsel tulemusel) korrati mõne aminohappe lisamist vaigule. Selleks suurendati reagentide ülehulka, pikendati reaktsioonigaega või vahetati aktivaatorit.

AsaAla kinnitamist N-kaitsmata H-SVA-NH-vaigule alustati asaAla-prekursori kloroatsüülimisest aktivaatoriga BTC, kasutades varasemalt väljatöötatud meetodit (Skeem 9).[1,16] Sooritati KT, mis oli negatiivne.



Skeem 9. AsaAla-prekursori kinnitumine tahkele kandjale, kus ● on tahke kandja ja R on peptiid.

Asa-alaniini kinnitumist tahkele kandjale analüüsiti ka HPLC-MS-iga. Selleks võeti kaks väikest kogust proovi ning eemaldati need tahkelt kandjalt. Ühelt proovilt eemaldati ka Fmoc-kaitserrühm, kuid antud ühendi neelduvust ei olnud UV-Vis-is näha. Tänu Fmoc-kaitserrühmas sisalduvale aromaatsusele oli Fmoc-asaASVA-NH₂ neeldumine UV-Vis-is detekteeritav ning neeldumis- ja massispektri põhjal (Lisa 1) veenduti asaAla seostumises H-SVA-NH-vaigule. N-kaitsmata H-asaASVA-NH-vaigule seoti järgmisena Arg aktivaator COMU-ga (10 ekv) (Skeem 10) (Tabel 1) ning kasutati pikemat reaktsioonigaega ja suuremat reagentide ülehulka, võrreldes peptiidsideme moodustamisega. Asa-peptiidsideme tekke kineetilise uurimusest on teada, et Arg kondensatsioonireaktsioon asaAla-le toimub 92% saagisega ning selle poolestusaeg on ligikaudu 1 h.[2]



Skeem 10. Asa-peptiidsideme moodustumine, kus R on peptiid, R1 on lisatava AH kõrvalrühm, ● on tahke kandja.

Arg seostumist vaigule kontrolliti KT-ga (positiivne) kui ka HPLC-MS-iga (Lisa 2), mille analüüsil leiti, et kõrvalproduktina oli tekkinud Fmoc-RSVA-NH₂. Tavapeptiidi Fmoc-RSVA-NH₂ teke näitab, et asaAla ei kinnitunud asa-aminohappe sidumisetapis täielikult. Neeldumisspektris (Lisa 1), kus kontrolliti asaAla seostumist vaigule, ei suudetud aga detekteerida peptiidi H-SVA-NH₂ sisaldust. Ühendi H-SVA-NH₂ mitteneelduvus UV-Vis-is 220 nm juures võis olla tingitud aromaatsuse puudumisest.

Korrati arginiini sidumise etappi (COMU 5 ekv), sest eelnevate analüüside ja KT tulemuste põhjal arvati, et reaktsioonisegus võis olla veel reageerimata H-asaASVA-NH-vaiku, mida ei suudetud detekteerida HPLC-MS-iga. Pärast teistkordset Arg sidumist sooritati KT (negatiivne) ning analüüsiti HPLC-MS-iga (Lisa 3). Asa-peptiidi Fmoc-RasaASVA-NH₂ kromatograafiline sisaldus peptiidi Fmoc-RSVA-NH₂ suhtes kasvas pärast teistkordset Arg sidumist 47%-lt 52%-le.

Järjestuse viimane Arg seoti N-kaitsmata H-RasaASVA-NH-vaigule kahel korral (Tabel 1), sest esimesel korral oli KT pärast aminohappe lisamist positiivne (sinakas). Teisel korral pikendati reaktsiooniga.

Seejärel analüüsiti H-RRasaASVA-NH₂ HPLC-MS-iga (Lisa 4), et veenduda asa-peptiidi järjestuses enne selle täielikku eemaldamist tahkelt kandjalt. Asa-peptiidi sisaldus toorproduktis enne puhastamist oli 29% (HPLC-MS 220 nm). Asa-toorpeptiidilt eemaldati ajutised ja püsivad kaitserühmad ning see lõigati tahkelt kandjalt, kuivatati lüofilisaatoris ja määrati mass. Asa-toorpeptiid puhastati kõrvalproduktidest preparatiivsel HPLC meetodil. H-RRasaASVA-NH₂ kromatograafiliseks puhtuseks saadi 94% (Lisa 5) ning saagis oli 1,3% (Lisa 6).

4.2 H-RRASVasaA-NH₂ süntees ja analüüs

Tabel 2. H-RRASVasaA-NH₂ süntees.

Järjestus/etapp	Aktivaator	t, (h)	KT	TLC test	HPLC-MS
Fmoc-asaA-NH -vaik	BTC (1,32 ekv)	3	+		
	BTC (1,32 ekv)	4	-		+ (Lisa 7)
Fmoc -kaitserühma eemaldamine				+	+
Fmoc -VasaA-NH-vaik	COMU (20 ekv)	68	-		+ (Lisa 8)
Fmoc -kaitserühma eemaldamine				+	+
Fmoc -SVasaA-NH-vaik	TBTU (3 ekv) HOBt (3 ekv)	2	+		
	TBTU (5 ekv) HOBt (5 ekv)	2	+		
	PyOxim (5 ekv)	5	-		
Fmoc -kaitserühma eemaldamine				+	
Fmoc -ASVasaA-NH-vaik	PyOxim (5 ekv)	3	-		
Fmoc -kaitserühma eemaldamine				+	
Fmoc -RASVasaA-NH-vaik	PyOxim (5 ekv)	4	-		
Fmoc -kaitserühma eemaldamine				+	
Fmoc -RRASVasaA-NH-vaik	HATU (5 ekv)	4	+		
	HATU (5 ekv)	16	-		
Fmoc -kaitserühma eemaldamine				+	+
Asa-toorpeptiid H-RRASVasaA-NH₂					+ (Lisa 9)
Puhastatud H-RRASVasaA-NH₂					+ (Lisa 10)

Asa-peptiidi H-RRASVasaA-NH₂ sünteesi (Tabel 2) alustati asaAla-prekursori sidumisega tahkele kandjale (Skeem 9). AsaAla sidumist tahkele kandjale tuli korrata, sest pärast esimest prekursori sidumist sooritatud KT oli positiivne. HPLC-MS-iga analüüsiti Fmoc-asaA-NH₂ neeldumis- ja massispektrit (Lisa 7) ja veenduti asaAla kinnitumises tahkele kandjale. Fmoc-kaitserühmas sisalduv aromaatsus võimaldas sünteesitud ühendit HPLC-MS-iga detekteerida.

Järgmisena seoti valiin aktivaator COMU-ga (20 ekv) kaitsmata H-asaA-NH-vaigule (Skeem 10) (Tabel 2). Val sidumiseks kasutati, võrreldes peptiidsideme sünteesimisega, oluliselt suuremat reagentide ülehulka ja pikemat reaktsiooniaega. Asa-peptiidsideme tekke kineetilise uurimusest on teada, et asa-alaniinile lisatava valiini kõrvalrühma steerilise efekti tõttu on reaktsiooni poolestusaeg 6,5 h ning 89%-lise saagisega.[2] Val kinnitumist vaigule kontrolliti nii KT-ga (kollane) kui ka HPLC-MS-iga (Lisa 8). HPLC-MS-is analüüsimiseks võeti sünteesitud ühendist kaks proovi, millest ühele neist jäeti külge Fmoc-kaitserühm. Fmoc-kaitserühmata ühendit ei suudetud analüüsil HPLC-MS-iga tuvastada. Fmoc-VasaA-NH₂ massispektri põhjal veenduti Val kinnitumises tahkele kandjale (Lisa 8). Neeldumis- ja massispektri (Lisa 8) põhjalikul analüüsimisel leiti, et eelnevas etapis ei olnud siiski aktiveeritud asaAla reageerinud kõikide tahke kandja vabade reaktsioonitsentritega. Selle tulemusel reageeris osa Val tahke kandja vabade aminorühmadega, millest järgnevate aminohapete lisamisel moodustus kõrvalproduktina tavapeptiid H-RRASV-NH₂.

Järgmised aminohapped lisati järjestusse SPPS eeskirja alusel ning saadi asa-peptiid H-RRASVasaA-NH₂ (Tabel 2). KT positiivsel tulemusel pärast aminohappe lisamise etappi, korraldati mõne aminohappe (seriini ja viimase arginiini) kinnitamist vaigule.

Sünteesitud asa-peptiidi neeldumis- ja massispektrit analüüsid, veenduti soovitud järjestuse saavutamises (Lisa 9) ja määrati asa-peptiidi sisaldus toorproduktis enne puhastamist, mis oli 52% (HPLC-MS 220 nm). Asa-toorpeptiid kuivatati lüofilisaatoris ja määrati selle mass. Seejärel puhastati asa-peptiid kõrvalproduktidest preparatiivsel HPLC meetodil. H-RRASVasaA-NH₂ kromatograafiliseks puhtuseks saadi 98% (Lisa 10) ja saagis on 1,8% (Lisa 6).

4.3 Hinnang H-RRASVasaA-NH₂ ja H-RRasaASVA-NH₂ sünteesile

Mõlema asa-peptiidi H-RRASVasaA-NH₂ ja H-RRasaASVA-NH₂ probleemseks sünteesietapiks oli asa-aminohappe sidumine peptiidijärjestusse või tahkele kandjale. H-RRasaASVA-NH₂ sünteesil lisati asaAla ühel korral, kuid kõrvalproduktina tekkinud tavapeptiidi H-RRSVA-NH₂ sisaldus oli väga suur. Asa-peptiidis H-RRASVasaA-NH₂ kinnitati asaAla kahel korral. Isegi kahekordsel asa-aminohappe kinnitamisel tahkele kandjale jäi veel märkimisväärne kogus vabu aminorühmi reageerimata ning tekkis kõrvalproduktina H-RRASV-NH₂. Sellest järeldub, et asa-aminohappe lisamine tahkele kandjale vajab veel täiendavat optimeerimist.

Varasemalt on teada, et problemaatiline sünteesietapp on asa-aminohappejäägile järgneva aminohappe lisamine, mis avaldus ka antud asa-peptiidide sünteesil. Asa-peptiidsideme efektiivseimaks moodustamiseks tuleb kasutada suuremat reagentide ülehulka ning pikendatud reaktsiooniga, võrreldes peptiidsideme moodustamisega, millest järeldub, et ka asa-peptiidsideme süntees nõuab täiendavat optimeerimist.

Asa-peptiidide H-RRasaASVA-NH₂ ja H-RRASVasaA-NH₂ sisaldused toorproduktides enne puhastamisprotsesse olid vastavalt 29% ja 52% (HPLC-MS 220 nm). Pärast puhastamist oli H-RRasaASVA-NH₂ puhtus 94% ja H-RRASVasaA-NH₂ 98%. Sünteesitud asa-peptiidide saagised olid <2% (Lisa 6), mis on võrreldavad siiani SPPS meetodil saadud asa-peptiidide sünteesi saagistega. Saagist alandasid puhastamise käigus tekkinud probleemid seoses asa-peptiidide lahustumisega kasutatud voolutis kui ka sünteesi käigus tehtud analüüsid: mitmel korral kontrolliti erinevate aminohapete ja asa-aminohappe prekursori kinnitumist HPLC-MS-iga ning sooritati mitmeid Kaiseri teste. Samuti vähendas asa-peptiidide saagist nende korduv ülekandmine erinevatesse reaktsiooninõudesse.

5. KOKKUVÕTE

Antud töö eesmärgiks oli sünteesida SPPS eeskirja järgi proteiinkinaas A substraadi RRASVA kaks asa-alaniini analoogi aktivaator COMU-ga. Tulemuseks saadi puhastatud asa-peptiidid H-RRasaASVA-NH₂ ja H-RRASVasaA-NH₂.

Rakendades SPPS-i metoodikat asa-peptiidisünteesil on reagentide kulu suurem, reaktsioonid toimuvad aeglasemalt ja mittetäielikult ning sellest tulenevalt on sünteesitud ja puhastatud asa-peptiidide saagis tunduvalt madalam võrreldes peptiidisünteesiga. Efektiivseks asa-peptiidide sünteesiks vajavad lahendamist kolm põhilist probleemi. Esiteks asa-aminohappe kinnitumine tahkele kandjale, sest isegi kahekordsel asa-aminohappe sidumisel ei toimunud kondensatsioonireaktsioon täielikult. Teiseks on veel vajalik optimeerida asa-peptiidsideme sünteesimetoodikat, sest SPPS eeskirja rakendamisel on reaktsiooniaeg pikem ning kasutatavate reagentide kulu suurem, võrreldes peptiidsideme sünteesiga. Kolmandaks vajab optimeerimist ka asa-peptiidide puhastamine HPLC meetodil.

Asa-peptiidi sünteesimeetodite arendamine on oluline asa-peptiidide heade omaduste ja mitmete kasutusvõimaluste tõttu. Ületades asa-peptiidisünteesi raskused, oleks võimalik suurendada sünteesi saagist ning vähendada reagentide kulu. Efektiivse asa-peptiidide sünteesieeskirja olemasolul oleks tulevikus võimalik sünteesida PKA substraadi RRASVA teisi asa-analooge ning mõõta nende fosforüleerimisreaktsioonide kineetikat ja võrrelda tulemusi tavapeptiidiga.

6. SUMMARY

In the present study two RRASVA aza-analogues H-RRasaASVA-NH₂ and H-RRASVasaA-NH₂ as minimal substrates for protein kinase A were synthesized using SPPS method. The coupling reagent COMU was used for aza-peptide bond formation.

Applying conventional SPPS methods on aza-peptide synthesis the quantity of reagents is bigger, coupling reactions take place more slowly and not completely comparing with peptide synthesis. Therefore, the synthesized aza-peptide yield is much lower than the peptide synthesis yield. There are three main problems which need to be solved to synthesize aza-peptides effectively. Firstly, aza-amino acid linking to solid resin, because even on double binding the coupling reaction did not occur completely. Secondly, it is still necessary to increase the yield of aza-peptide bond, because using SPPS methods the reaction time is longer and there is higher reagent consumption comparing with conventional peptide bond synthesis. Thirdly, the purification of aza-peptides needs to be optimized.

In conclusion, the methods of aza-peptide synthesis need to be developed, because of the aza-peptide's good properties and many opportunities of use. By overcoming the difficulties of aza-peptide synthesis, it would be possible to increase the yield of synthesis and reduce the quantity of reagents. In the existence of effective synthesis methods, it would be possible in the future to synthesize the other aza-analogues of RRASVA substrates of the PKA and measure the kinetics of their phosphorylation reactions and compare the results with the parent peptide.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Arujõe, M.; Ploom, A.; Mastitski, A.; Järv, J. Comparison of Various Coupling Reagents in Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2017**, 58 (35), 3421–3425.
2. Arujõe, M.; Ploom, A.; Mastitski, A.; Järv, J. Influence of Steric Effects in Solid-Phase Aza-Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2018**, 59 (21), 2010–2013.
3. Eller, M.; Sepp, A.; Toomik, R.; Ekman, P.; Järv, J.; Ragnarsson, U.; Engström, L. Studies on the Substrate Specificity of CAMP-Dependent Protein Kinase Using Diastereomeric Peptides. *Biochem. Int.* **1991**, 25 (3), 453–460.
4. Kisseljova, K.; Kuznetsov, A.; Baudy-Floc'H, M.; Järv, J. Effect of Two Simultaneous Aza-β 3-Amino Acid Substitutions on Recognition of Peptide Substrates by CAMP Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit. *Bioorganic Chem.* **2011**, 39 (4), 133–137.
5. Carey, F. A.; Giuliano, R. M. *Orgaaniline keemia: õpik kõrgkoolidele*; Tallinna Tehnikaülikooli Kirjastus: Tallinn, 2014, pp 1116-1173.
6. L. G. Wade Jr. *Organic Chemistry*, 8th edition.; Pearson: Boston, 2012, pp 1155-1200.
7. Sewald, N.; Jakubke, H.-D. *Peptides: Chemistry and Biology*; Wiley-VCH, 2002, pp 5-60.
8. Gentilucci, L.; de, M.; Cerisoli, L. Chemical Modifications Designed to Improve Peptide Stability: Incorporation of Non-Natural Amino Acids, Pseudo-Peptide Bonds, and Cyclization. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16 (28), 3185–3203.
9. Tymoczko, J. L.; Berg, J. M.; Stryer, L. *Biochemistry: A Short Course*, International 2nd ed.; Freeman Palgrave/Macmillan: New York, 2013, pp 215-234.
10. Avan, I.; Hall, C. D.; Katritzky, A. R. Peptidomimetics via Modifications of Amino Acids and Peptide Bonds. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43 (10), 3575–3594.
11. Lau, J. L.; Dunn, M. K. Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**.
12. Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatisky, M. Synthetic Therapeutic Peptides: Science and Market. *Drug Discov. Today* **2010**, 15 (1), 40–56.
13. Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V. J. Peptidomimetics, a Synthetic Tool of Drug Discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12 (3), 292–296.
14. Trabocchi, A.; Guarana, A. *Peptidomimetics in Organic and Medicinal Chemistry*; John Wiley and Sons Ltd, 2014, p. 5.
15. Proulx, C.; Sabatino, D.; Hopewell, R.; Spiegel, J.; García Ramos, Y.; Lubell, W. D. Azapeptides and Their Therapeutic Potential. *Future Med. Chem.* **2011**, 3 (9), 1139–1164.

16. Boeglin, D.; Lubell, W. D. Aza-Amino Acid Scanning of Secondary Structure Suited for Solid-Phase Peptide Synthesis with Fmoc Chemistry and Aza-Amino Acids with Heteroatomic Side Chains. *J. Comb. Chem.* **2005**, 7 (6), 864–878.
17. Gante, J. Azapeptides. *Synthesis* **1989**, 21 (06), 405–413.
18. Chingle, R.; Proulx, C.; Lubell, W. D. Azapeptide Synthesis Methods for Expanding Side-Chain Diversity for Biomedical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, 50 (7), 1541–1556.
19. Croom, K. F.; Dhillon, S.; Keam, S. J. Atazanavir. *Drugs* **2009**, 69 (8), 1107–1140.
20. Swainston Harrison, T.; Scott, L. J. Atazanavir: A Review of Its Use in the Management of HIV Infection. *Drugs* **2005**, 65 (16), 2309–2336.
21. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (14), 2149–2154.
22. Jensen, K. J. Solid-Phase Peptide Synthesis: An Introduction. In *Peptide Synthesis and Applications*; Methods in Molecular Biology; Humana Press, Totowa, NJ, 2013; pp 1–21.
23. Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2006**, 33 (3), 239–254.
24. Mäde, V.; Els-Heindl, S.; Beck-Sickinger, A. G. Automated Solid-Phase Peptide Synthesis to Obtain Therapeutic Peptides. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, 10, 1197–1212.
25. Shelton, P. T.; Jensen, K. J. Linkers, Resins, and General Procedures for Solid-Phase Peptide Synthesis. In *Peptide Synthesis and Applications*; Methods in Molecular Biology; Humana Press, Totowa, NJ, 2013; pp 23–41.
26. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61 (46), 10827–10852.
27. Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. Recent Development in Peptide Coupling Reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, 16 (2), 97–116.
28. Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (2), 606–631.
29. Chantell, C. A.; Onaiyekan, M. A.; Menakuru, M. Fast Conventional Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: A Comparative Study of Different Activators. *J. Pept. Sci.* **2012**, 18 (2), 88–91.
30. Hachmann, J.; Lebl, M. Search for Optimal Coupling Reagent in Multiple Peptide Synthesizer. *Pept. Sci.* **84** (3), 340–347.
31. Jad, Y. E.; de la Torre, B. G.; Govender, T.; Kruger, H. G.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma-T, Expanding the Arsenal of Coupling Reagents. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57 (31), 3523–3525.

32. Subirós-Funosas, R.; Nieto-Rodriguez, L.; Jensen, K. J.; Albericio, F. COMU: Scope and Limitations of the Latest Innovation in Peptide Acyl Transfer Reagents. *J. Pept. Sci.* **2013**, *19* (7), 408–414.
33. El-Faham Ayman; Funosas Ramon Subirós; Prohens Rafel; Albericio Fernando. COMU: A Safer and More Effective Replacement for Benzotriazole-Based Uronium Coupling Reagents. *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15* (37), 9404–9416.
34. Mastitski, A.; Haljasorg, T.; Kipper, K.; Järv, J. Synthesis of Aza-Phenylalanine, Aza-Tyrosine, and Aza-Tryptophan Precursors via Hydrazine Alkylation. *Proc. Est. Acad. Sci.* **2015**, *64* (2), 168–178.
35. Mastitski, A.; Kisseljova, K.; Järv, J. Synthesis of the Fmoc-Aza-Arg(Boc)₂ Precursor via Hydrazine Alkylation. *Proc. Est. Acad. Sci.* **2014**, *63* (4), 438–443.
36. Mastitski, A.; Jarv, J. One-Pot Synthesis of Fmoc-and Boc-Protected Aza-Methionine Precursors from 2-Methylthioacetaldehyde Dimethyl Acetal. *Org. Prep. Proced. Int.* **2014**, *46* (6), 559–564.
37. Zega, A.; Urleb, U. Azapeptides. *Acta Chim. Slov.* **2002**, *49* (4), 649–662.
38. Nigst, T. A.; Antipova, A.; Mayr, H. Nucleophilic Reactivities of Hydrazines and Amines: The Futile Search for the α -Effect in Hydrazine Reactivities. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (18), 8142–8155.
39. Shen, K.; Hines, A. C.; Schwarzer, D.; Pickin, K. A.; Cole, P. A. Protein Kinase Structure and Function Analysis with Chemical Tools. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2005**, *1754* (1), 65–78.
40. Schwartz, P. A.; Murray, B. W. Protein Kinase Biochemistry and Drug Discovery. *Bioorganic Chem.* **2011**, *39* (5), 192–210.
41. Roskoski, R. A Historical Overview of Protein Kinases and Their Targeted Small Molecule Inhibitors. *Pharmacol. Res.* **2015**, *100*, 1–23.
42. Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **2002**, *298* (5600), 1912–1934.
43. Leroux, A. E.; Schulze, J. O.; Biondi, R. M. AGC Kinases, Mechanisms of Regulation and Innovative Drug Development. *Semin. Cancer Biol.* **2018**, *48*, 1–17.
44. Kisseljova, K. Synthesis of Aza-B₃-Amino Acid Containing Peptides and Kinetic Study of Their Phosphorylation by Protein Kinase A. Thesis, 2012.
45. Knighton, D. R.; Zheng, J. H.; Eyck, L. T.; Ashford, V. A.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M. Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *Science* **1991**, *253* (5018), 407–414.

46. Järv, J.; Ragnarsson, U. Linear Free Energy Relationships in CAMP-Dependent Protein Kinase Reactions with Synthetic Substrates. *Bioorganic Chem.* **1991**, *19* (1), 77–87.
47. Zetterqvist, Ö.; Ragnarsson, U.; Humble, E.; Berglund, L.; Engström, L. The Minimum Substrate of Cyclic AMP-Stimulated Protein Kinase, as Studied by Synthetic Peptides Representing the Phosphorylatable Site of Pyruvate Kinase (Type L) of Rat Liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *70* (3), 696–703.
48. Kisseljova, K.; Kuznetsov, A.; Baudy-Floc'H, M.; Järv, J. Aza-B3-Amino Acid Containing Peptidomimetics as CAMP-Dependent Protein Kinase Substrates. *Bioorganic Chem.* **2010**, *38* (5), 229–233.
49. Subirós-Funosas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. PyOxP and PyOxB: The Oxyma-Based Novel Family of Phosphonium Salts. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (16), 3665–3673.
50. Eissler, S.; Kley, M.; Bächle, D.; Loidl, G.; Meier, T.; Samson, D. Substitution Determination of Fmoc-Substituted Resins at Different Wavelengths. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* **2017**, *23* (10), 757–762.
51. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34* (2), 595–598.
52. Benoiton, N. L. *Chemistry of Peptide Synthesis*; CRC Press, 2005, pp 129-131.

TÄNUAVALDUS

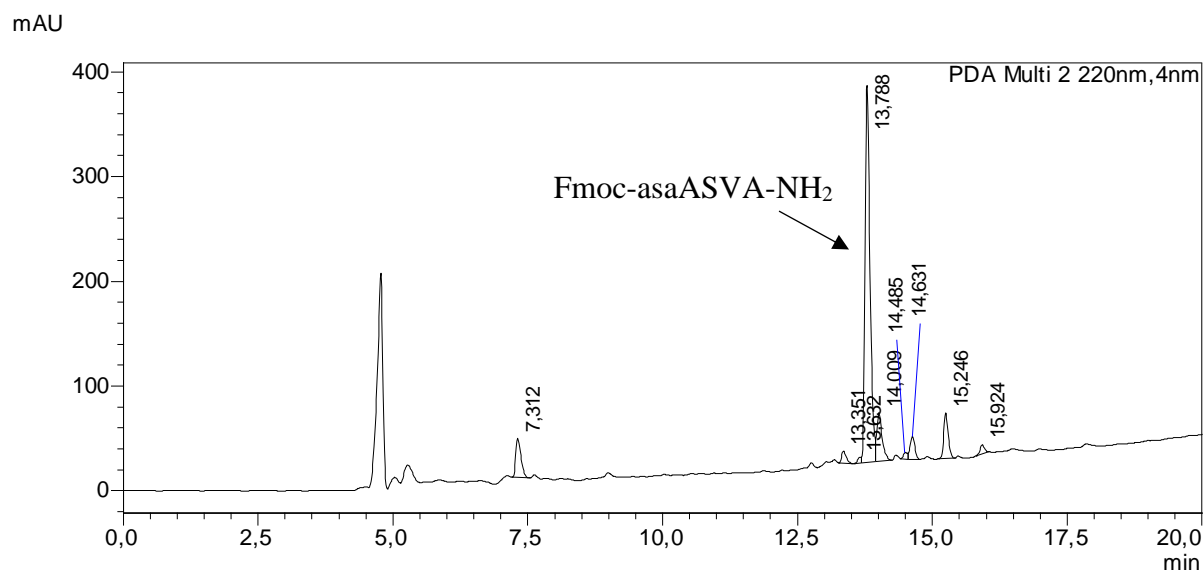
Töö autor avaldab suurt tänu oma juhendajatele dr Anu Ploomile ja Meeli Arujõe (MSc), kes aitasid kaasa töö valmimisele. Autor on juhendajatele tänulik suure ajapanuse, saadud soovitude ja heade nõuannete eest.

Autor soovib tänada ka Anton Mastitski (MSc) teadusgruppi asa-Ala prekursori sünteesimise eest.

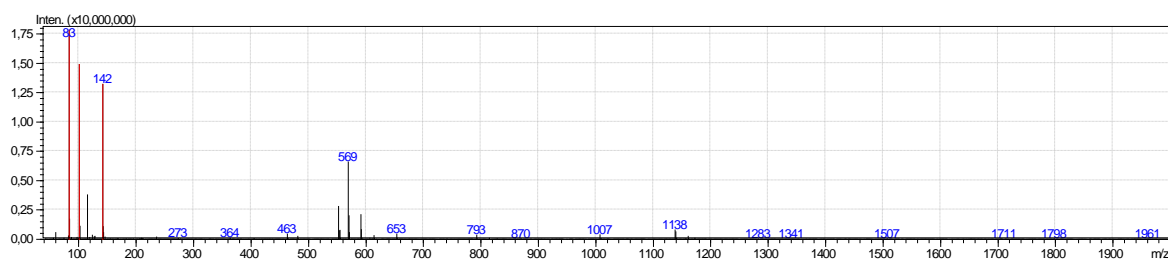
LISAD

Lisa 1. Fmoc-asaASVA-NH₂ neeldumis- (a) ja massispekter (b).

a)



b)

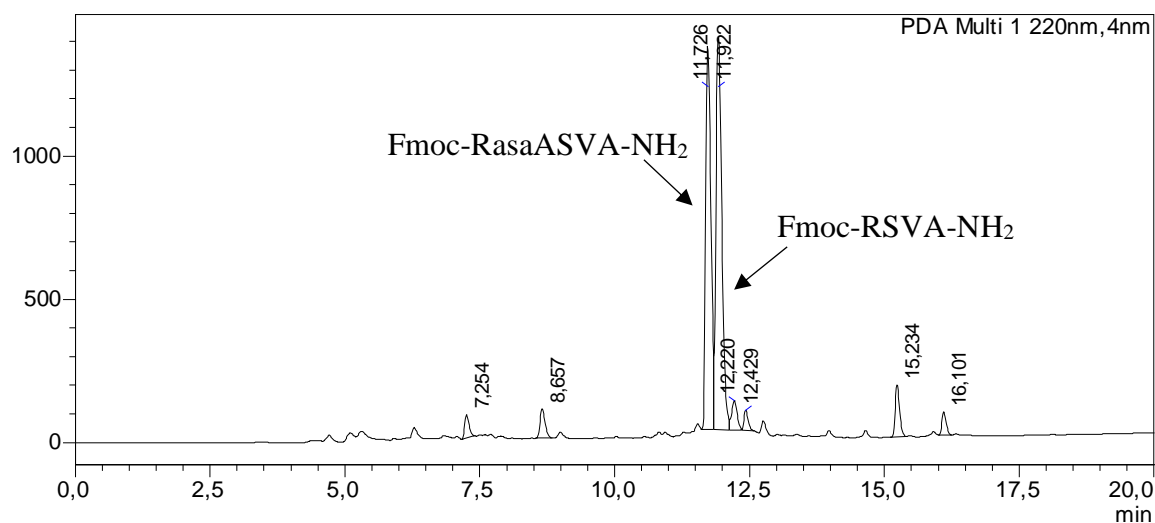


Ühend	M, g/mol	[M+H] ⁺ , g/mol	[M+Na] ⁺ , g/mol	[2M+2H] ²⁺ , g/mol
Fmoc-asaASVA-NH ₂	568	569	590	1138

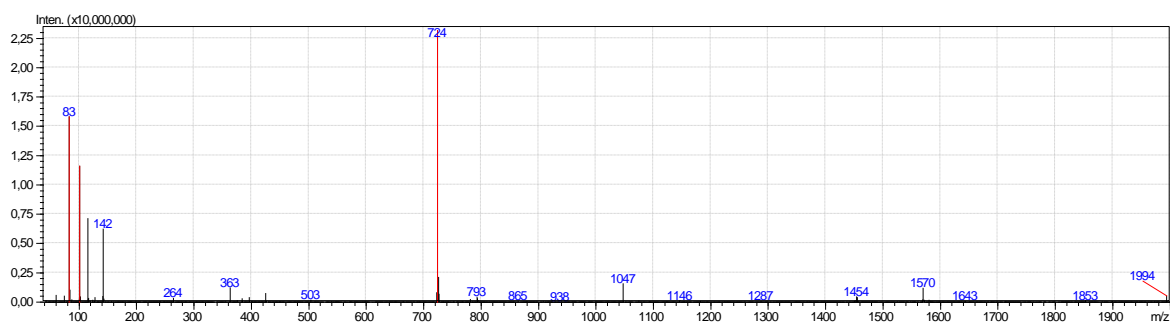
Lisa 2. Fmoc-RasaASVA-NH₂ (COMU 10 ekv, 16 h) neeldumis- (a) ja massispekter (b).

a)

mAU



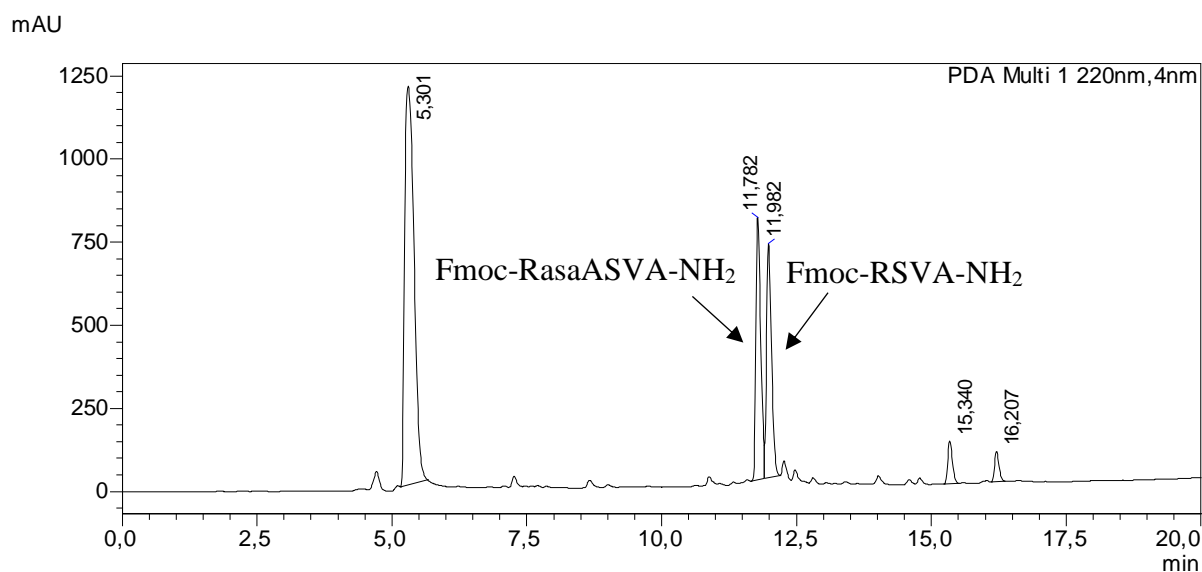
b)



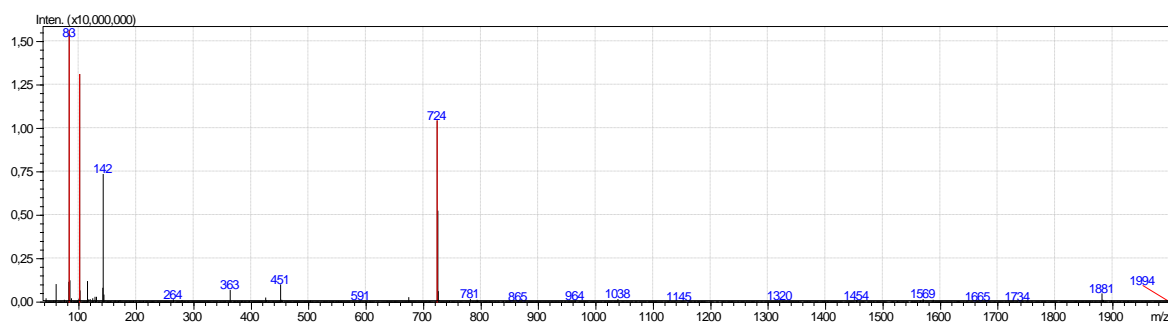
Ühend	$[M+2H]^{2+}$, g/mol	M, g/mol	$[M+H]^+$, g/mol
Fmoc-RasaASVA-NH ₂	363	723	724

Lisa 3. Fmoc-RasaASVA-NH₂ (COMU 5 ekv, 22 h) neeldumis- (a) ja massispekter (b).

a)



b)

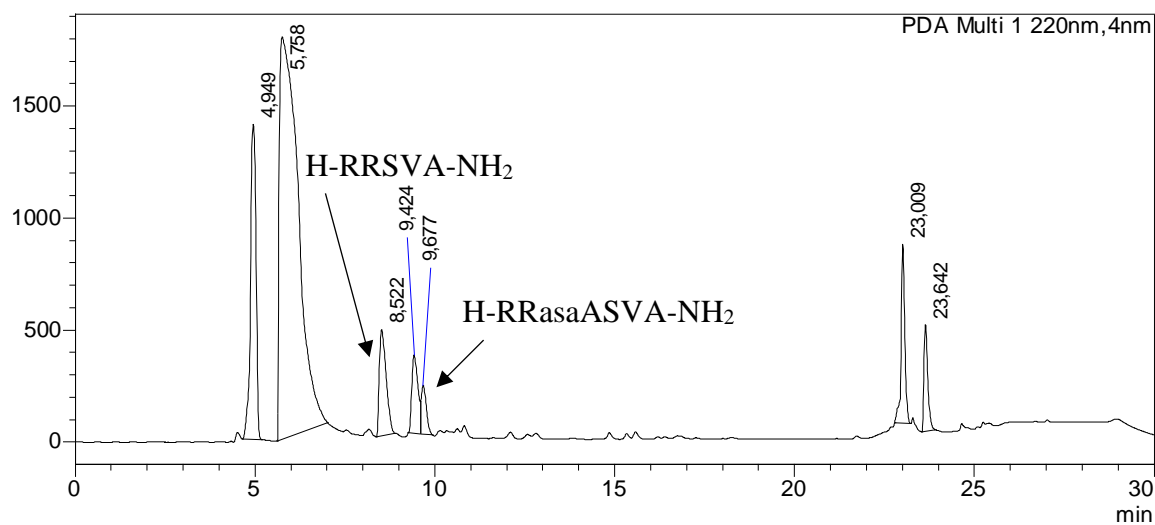


Ühend	$[M+2H]^{2+}$, g/mol	M, g/mol	$[M+H]^+$, g/mol
Fmoc-RasaASVA-NH ₂	363	723	724

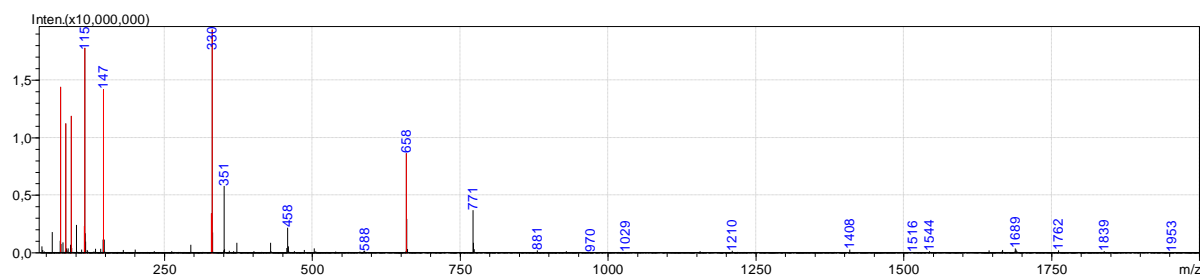
Lisa 4. H-RRasaASVA-NH₂ neeldumis- (a) ja massispekter (b) enne puhastamist.

a)

MAU

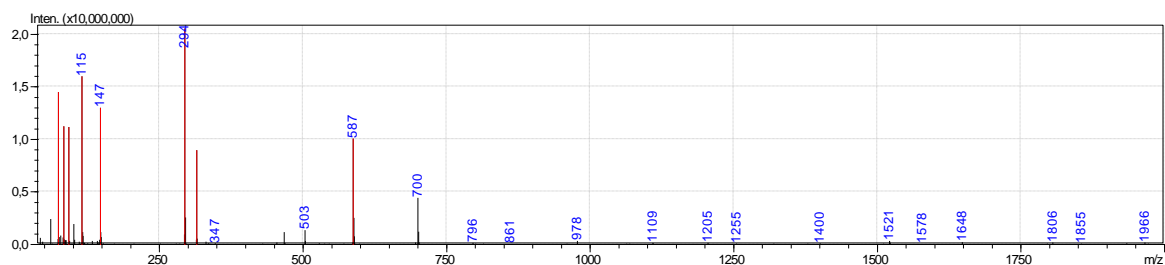


b) Asa-peptiid H-RRasaASVA-NH₂ (RT 9,424; 9,677)



Ühend	[M+2H] ²⁺ , g/mol	[M+ACN+2H] ²⁺ , g/mol	M, g/mol
H-RRasaASVA-NH ₂	330	351	658

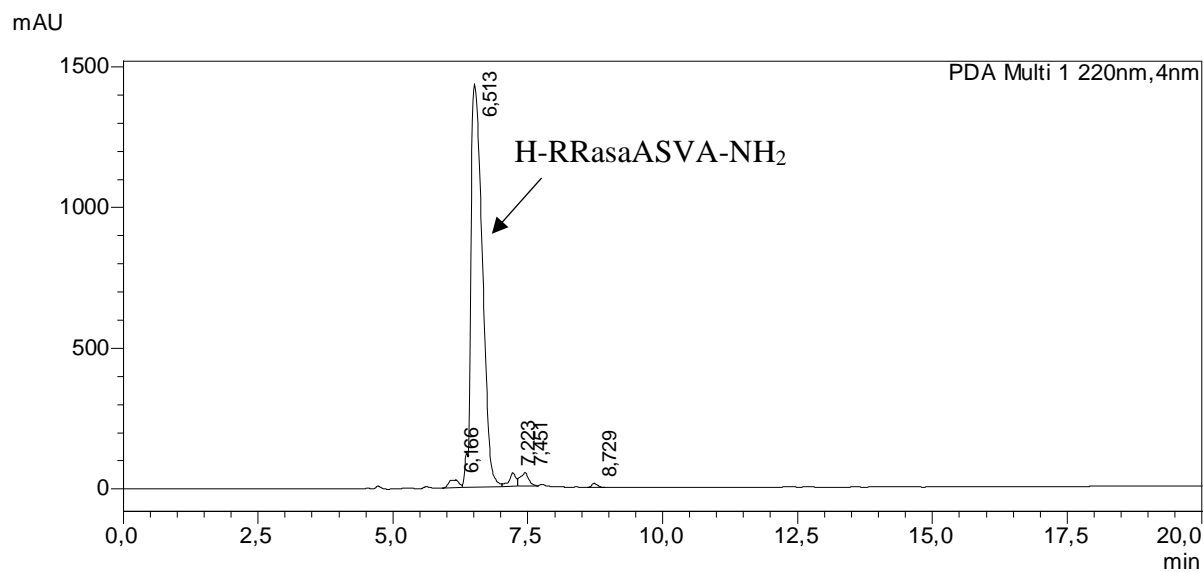
Tavapeptiid H-RRSVA-NH₂



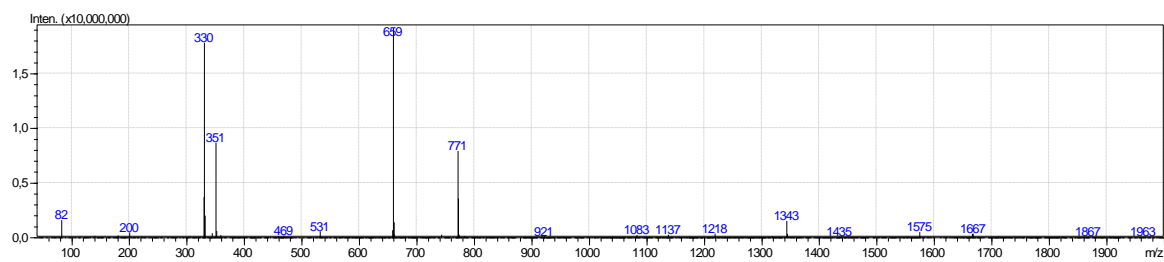
Ühend	[M+2H] ²⁺ , g/mol	[M+ACN+2H] ²⁺ , g/mol	M, g/mol	[M+H] ⁺ , g/mol
H-RRSVA-NH ₂	294	315	586	587

Lisa 5. Puhastatud H-RRasaASVA-NH₂ neeldumis- (a) ja massispekter (b).

a)



b)



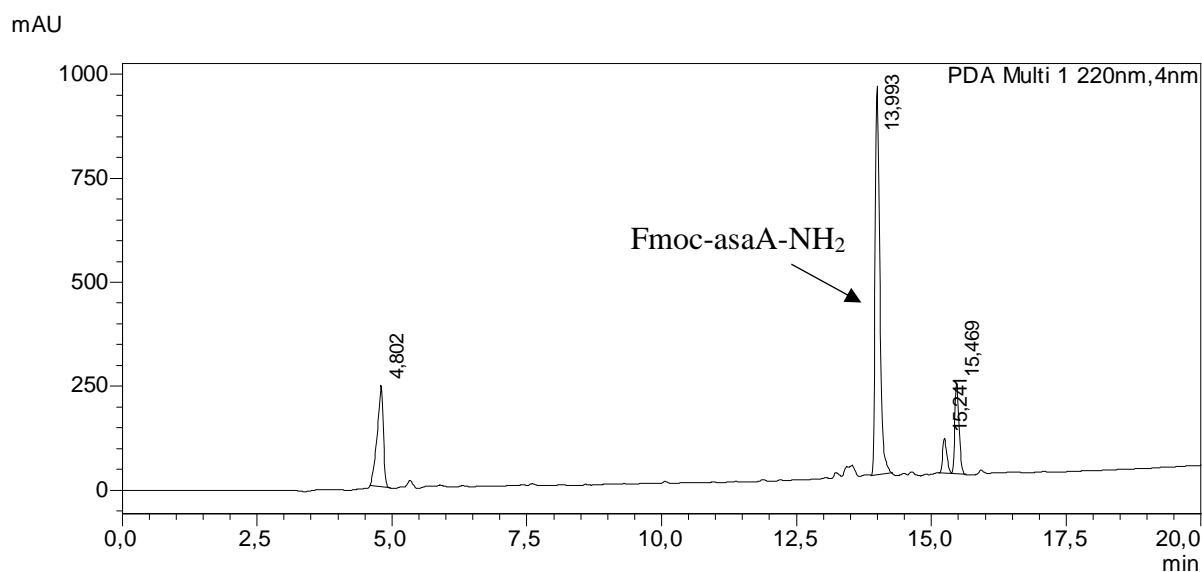
Ühend	$[M+2H]^{2+}$, g/mol	$[M+ACN+2H]^{2+}$, g/mol	M, g/mol	$[M+H]^+$, g/mol
H-RRasaASVA-NH ₂	330	351	658	659

Lisa 6. H-RRasaASVA-NH₂ ja H-RRASVasaA-NH₂ massid ja saagised.

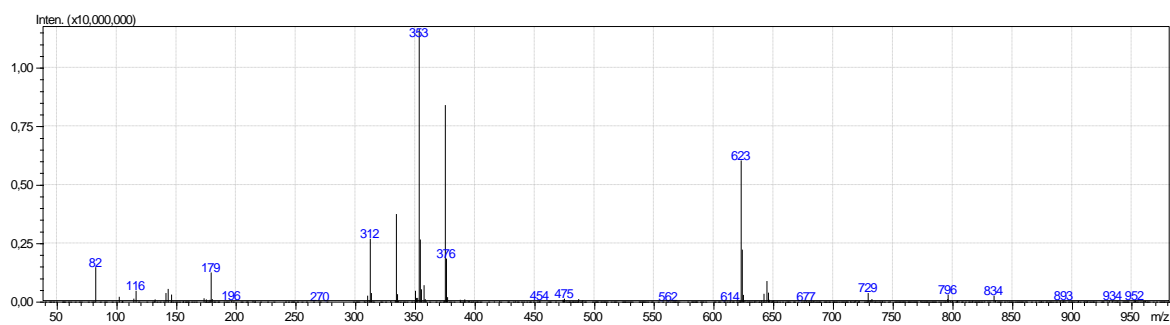
	H-RRasaASVA-NH₂	H-RRASVasaA-NH₂
Asa-toorpeptiidi kaalutis	63,57 mg	54,07 mg
Asa-peptiidi sisaldus enne puhastamist (HPLC-MS 220 nm)	29 %	52 %
Asa-peptiidi sisaldus pärast puhastamist (HPLC-MS 220 nm)	94 %	98 %
Asa-peptiidi kaalutis pärast puhastamist	1,43 mg	1,97 mg
Teoreetiline mass	111,7 mg	111,7 mg
Saagis pärast puhastamist	1,3 %	1,8 %

Lisa 7. Fmoc-asaA-NH₂ neeldumis- (a) ja massispekter (b).

a)



b)

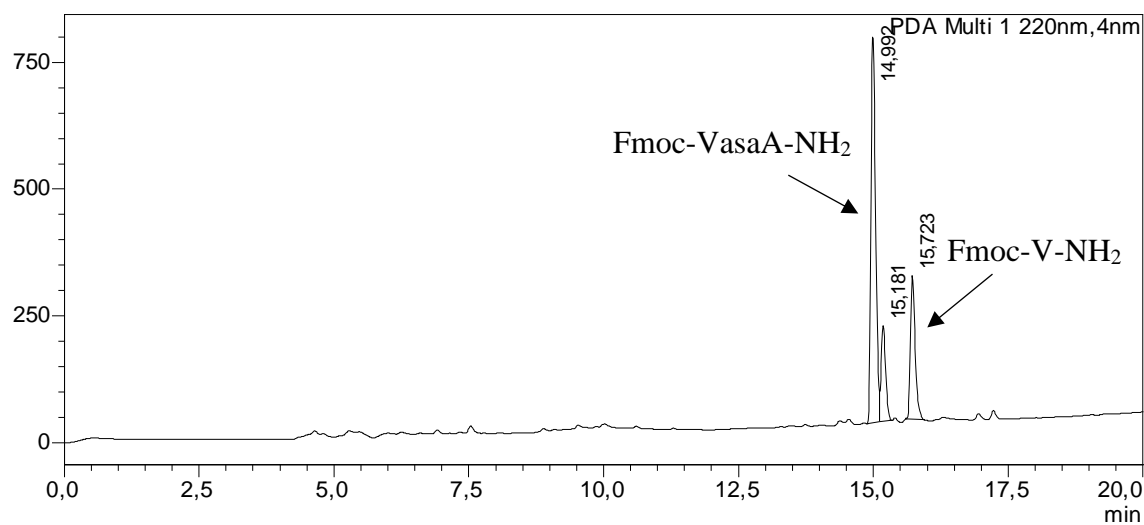


Ühend	M, g/mol	[M+H] ⁺ , g/mol	[M+Na] ⁺ , g/mol	[M+ACN+H] ⁺ , g/mol	[M+ACN+Na] ⁺ , g/mol	[2M+H] ⁺ , g/mol
Fmoc-asaA-NH ₂	311	312	333	353	375	623

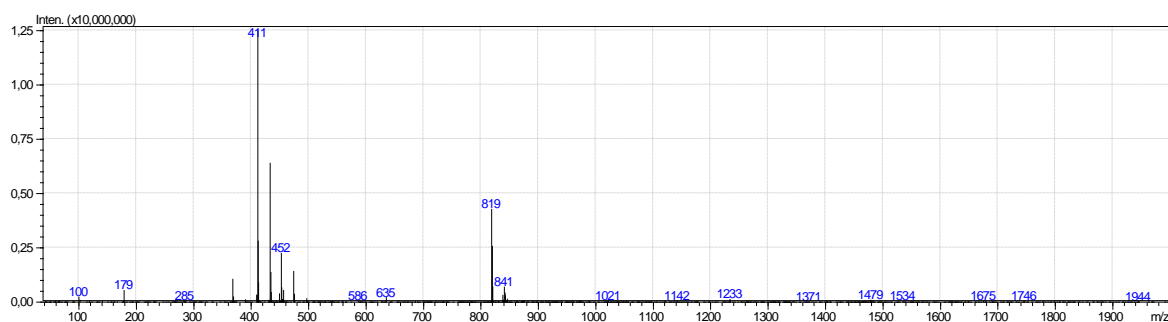
Lisa 8. Fmoc-VasaA-NH₂ neeldumis- (a) ja massispekter (b).

a)

mAU



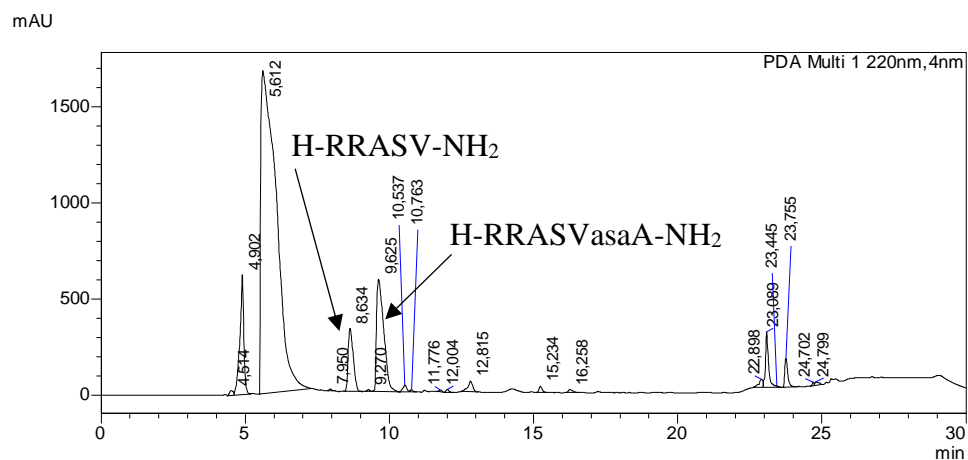
b)



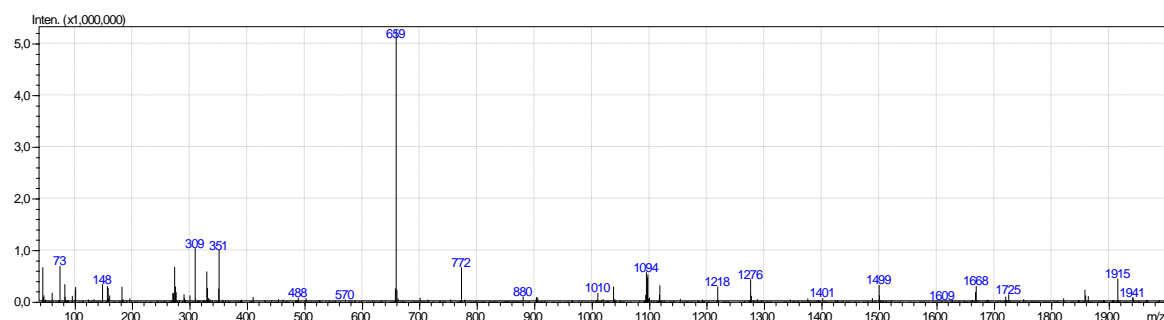
Ühend	M, g/mol	[M+H] ⁺ , g/mol	[M+Na] ⁺ , g/mol	[M+ACN+H] ⁺ , g/mol	[M+ACN+Na] ⁺ , g/mol
Fmoc-VasaA-NH ₂	410	411	432	452	474

Lisa 9. H-RRASVasaA-NH₂ neeldumis- (a) ja massispekter (b) enne puhastamist.

a)

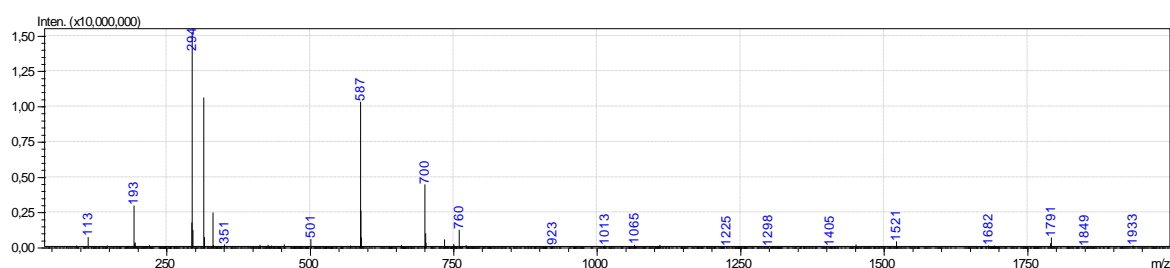


b) Asa-peptiid H-RRASVasaA-NH₂ (RT 9,625)



Ühend	$[M+2H]^{2+}$, g/mol	$[M+ACN+2H]^{2+}$, g/mol	M, g/mol	$[M+H]^+$, g/mol
H-RRASVasaA-NH ₂	330	351	658	659

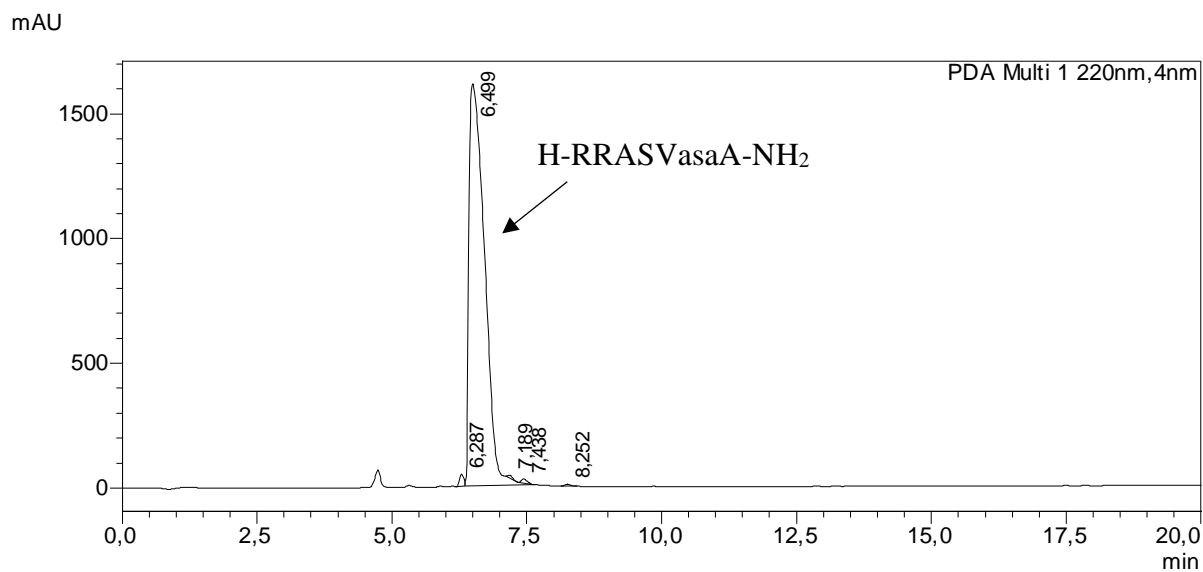
Tavapeptiid H-RRASV-NH₂ (RT 8,634)



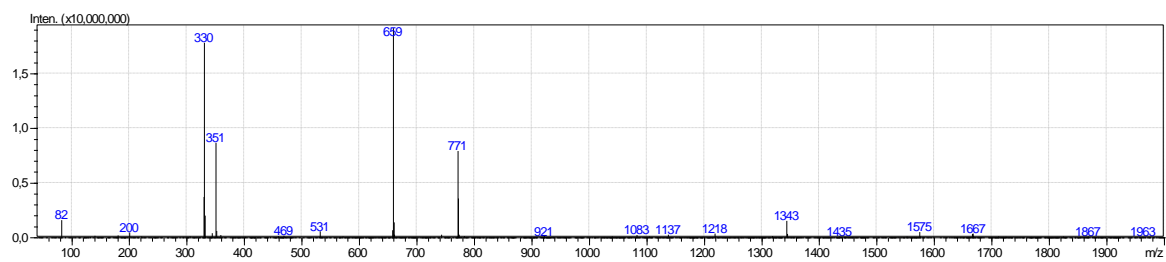
Ühend	$[M+2H]^{2+}$, g/mol	$[M+ACN+2H]^{2+}$, g/mol	M, g/mol	$[M+H]^+$, g/mol
H-RRASV-NH ₂	294	315	586	587

Lisa 10. Puhastatud H-RRASVasaA-NH₂ neeldumis- (a) ja massispekter (b).

a)



b)



Ühend	$[M+2H]^{2+}$, g/mol	$[M+ACN+2H]^{2+}$, g/mol	M, g/mol	$[M+H]^+$, g/mol
H-RRASVasaA-NH ₂	330	351	658	659

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Egle Truuman,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
„Proteiinkinaas A substraadi RRASVA asa-analoogide süntees aktivaator COMU-ga“,

mille juhendajad on Anu Ploom (PhD) ja Meeli Arujõe (MSc)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus **30.05.2018**